

**Biochemische und strukturelle Untersuchungen der
Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen CODH-II und CODH-IV aus
*Carboxydotherrnus hydrogenoformans***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc. Lilith Domnik

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen	1. Prof. Dr. Holger Dobbek
	2. Prof. Dr. Athina Zouni
	3. Prof. Dr. Peter Hildebrandt

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2018

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek in der Arbeitsgruppe Strukturbioogie / Biochemie von Oktober 2013 bis Oktober 2017 an der Humboldt-Universität zu Berlin durchgeführt. Im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation wurde an folgenden Publikationen mitgewirkt:

L. Domnik, M. Merrouch, S. Goetzl, J.-H. Jeoung, C. Léger, S. Dementin, V. Fourmond, H. Dobbek. CODH-IV: A novel high efficiency CO-scavenging CO dehydrogenase with increased resistance to O₂. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2017) *in press*.

A. Ciaccafava, D. Tombolelli, L. Domnik, J.-H. Jeoung, H. Dobbek, M.-A. Mroginski, I. Zebger, P. Hildebrandt. Carbon Monoxide Dehydrogenase Reduces Cyanate to Cyanide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 113, 7398-7401 (2017).

A. Ciaccafava, D. Tombolelli, L. Domnik, J. Fessler, J.-H. Jeoung, H. Dobbek, M.-A. Mroginski, I. Zebger, P. Hildebrandt. When the Inhibitor tells more than the Substrate: The cyanide-bound state of a Carbon Monoxide Dehydrogenase. *Chem. Sci.* 7 (5), 3162–3171 (2016).

M. Merrouch, J. Hadj-Said, L. Domnik, H. Dobbek, C. Léger, S. Dementin, V. Fourmond. O₂ Inhibition of Ni-Containing CO Dehydrogenase Is Partly Reversible. *Chem. Eur. J.* 21 (52), 18934–18938 (2015).

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ACS	Acetyl-CoA-Synthase
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. hydrogenoformans</i> / <i>Ch</i>	<i>Carboxydotherrmus hydrogenoformans</i>
Cam	Chloramphenicol
CBB	Coomassie-Brilliant-Blau
CCP4	Collaborative Computational Project 4
CoA	Coenzym A
CODH	Kohlenmonoxid-Dehydrogenase
CoFeSP	corrinoide Fe-S-Protein
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
DT	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
<i>D. vulgaris</i> / <i>Dv</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavinadenindinukleotid
FNR	Fumarat- und Nitratreduktase
Gl.	Gleichung
HCP	Hybrid-Cluster-Protein
HiPIP	<i>high potential iron-sulfur protein</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
MCD	Molybdopterin-Cytosin-Dinukleotid
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MeTr	Methyltransferase
<i>M. thermoacetica</i> / <i>Mt</i>	<i>Moorella thermoacetica</i>
mTB-Medium	modifiziertes <i>terrific-broth</i> Medium
MV	Methylviologen
MW	Molekulargewicht
nBIC	n-Butylisocyanid
OHx	Wasser oder Hydroxylgruppe
<i>O. carboxydovorans</i> / <i>Oc</i>	<i>Oligotropha carboxydovorans</i>
Ox	Oxidiert
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pdb-ID	Proteindatenbank-Identifikationsnummer
PEG	Polyethylenglykol
Red	Reduziert
r.m.s.	<i>root mean square</i>
<i>R. rubrum</i> / <i>Rr</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOB	<i>super optimal broth</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
UV/vis	Ultravioletter und sichtbarer Bereich
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
WT	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) ist ein Schlüsselenzym des reduktiven Acetyl-CoA Wegs, und katalysiert in diesem die Reduktion von CO_2 zu CO mit Raten von bis zu 12 s^{-1} . Die Rückreaktion, die Oxidation von CO, katalysiert die CODH mit Raten von bis zu 31000 s^{-1} . Beide Reaktionen finden am aktiven Zentrum des Enzyms, einem $[\text{NiFe}_4\text{S}_4\text{OH}_x]$ -Cluster (C-Cluster), statt. Das Genom des hydrogenogenen Bakteriums *C. hydrogenoformans* beinhaltet fünf putative CODHs, welche vermutlich unterschiedliche Funktionen im Organismus ausüben. Diese Arbeit charakterisiert CODH-II und CODH-IV strukturell und biochemisch. In CODH-II wurden Seitenketten der 1. und 2. Koordinationssphäre des C-Clusters ausgetauscht und einer strukturellen und kinetischen Analyse unterzogen. Die Seitenketten H93, K563 und H96 sind vermutlich Bestandteil eines Protonentransfernetzwerks. Zudem übernehmen die Seitenketten H93 und K563 wahrscheinlich bei der CO-Oxidation eine Rolle in der Stabilisierung des Carboxylat-gebundenen Komplexes. Die Seitenkette I567 ist 5.4 \AA oberhalb des Nickels am Beginn eines der hydrophoben Gaskanäle lokalisiert und könnte vor allem an der Stabilisierung des Nickels im C-Cluster beteiligt sein. Ferner konnte der C-Cluster in einen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster transformiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit analysiert den Einfluss von O_2 auf CODH-II und CODH-IV. In Lösung zeigte CODH-II bei Inkubation mit O_2 einen Verlust der CO-Oxidationsaktivität. Analog dazu konnte in CODH-II Kristallen die Zerstörung des C-Clusters durch O_2 verfolgt werden. Der C-Cluster bildet zunächst einen Sulfid-gebundenen intermediären Zustand aus, welcher den Cluster temporär vor der Zerstörung durch O_2 schützen könnte. Im weiteren Verlauf der Zerstörung ersetzt ein Fe-Atom das Ni-Atom des Clusters, und die S-Atome verschwinden bis nach 24 h nur die Fe-Atome des Clusters übrig sind. Zudem wurde die Struktur eines putativen C_{ox} -Zustands, welcher durch die Destabilisierung des Fe_4 gekennzeichnet ist, in CODH-II identifiziert. Elektrochemisch wurde das Verhalten der CODH-II in der Gegenwart von O_2 mit der CODH-IV, für welche eine Rolle in der oxidativen Stressantwort von *C. hydrogenoformans* diskutiert wird, verglichen. CODH-IV ist sauerstofftoleranter als CODH-II und katalysiert die Oxidation von CO hocheffizient nahe des CO-Diffusionslimits. Die Aufklärung der Struktur von CODH-IV erlaubte die Identifikation einer möglichen Ursache der höheren O_2 -Toleranz. Die Strukturen beider CODHs ähneln sich stark. Allerdings weist CODH-IV an der Rückseite des C-Clusters eine dichtere Packung der Seitenketten auf, wodurch der Cluster von einem Angriff durch O_2 abgeschirmt werden könnte.

ABSTRACT

CO-Dehydrogenase (CODH) is a key enzyme of the reductive acetyl-CoA pathway, in which it catalyses the reduction of CO₂ to CO with rates up to 12 s⁻¹. CODH catalyses the reverse reaction, the oxidation of CO with rates up to 31000 s⁻¹. Both reactions take place at the active site of the enzyme, a [NiFe₄S₄OH_x] cluster (cluster C). The genome of the hydrogenogenic bacterium *C. hydrogenoformans* contains five putative CODHs which might serve distinctive functions within the organism. This study characterises CODH-II and CODH-IV structurally and biochemically. Residues of the first and second coordination sphere of cluster C from CODH-II were exchanged and analysed concerning their structural and biochemical properties. The residues H93, K563 and H96 might be part of a proton transfer relay network in CODH-II. Furthermore, residues H93 and K563 might stabilize the carboxylate-bound intermediate during CO-oxidation. The residue I567 is localised 5.4 Å above the Ni-Atom of cluster C at the beginning of a hydrophobic gas-channel. It might stabilize the Ni-Atom of cluster C. Moreover, cluster C could be transformed into a [Fe₄S₄]-cluster.

The second part of this study analyses the influence of O₂ on CODH-II and CODH-IV. CODH-II showed in solution a loss in CO-oxidation activity upon incubation with O₂. In an analogous experiment, the destruction of cluster C by O₂ was followed crystallographically. Cluster C converts initially into a sulfide-bound state, which might be able to protect the cluster temporary from destruction by O₂. In the further course of the destruction an Fe-atom replaces the Ni-atom of cluster C and the S-atoms vanish leaving after 24 h only the Fe-atoms behind. The structure of a putative C_{ox} state of cluster C could be identified, which is characterised by the destabilisation of its Fe₄. A role for CODH-IV in the oxidative stress response of *C. hydrogenoformans* has been discussed previously. Therefore, the behaviour of CODH-II and CODH-IV was analysed electrochemically in the presence of O₂. CODH-IV is more O₂-tolerant than CODH-II and catalyses the oxidation of CO with high efficiency close to the diffusion limit of CO. Reasons for the enhanced O₂-tolerance of CODH-IV could be deduced by elucidating its structure. Generally, both CODHs show high structural similarity. However, at the backside of cluster C CODH-IV shows a tighter packing of residues by which the cluster C might be shielded from O₂.

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE EVOLUTION VON EISEN-SCHWEFEL PROTEINEN	1
1.1.1	CHEMIE DES SAUERSTOFFS	2
1.1.2	EISEN-SCHWEFEL-PROTEINE UND SAUERSTOFF	3
1.2	KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASEN	5
1.2.1	CHEMIE DES KOHLENMONOXIDS	5
1.2.2	CHEMIE DES KOHLENDIOXIDS	6
1.2.3	DER REDUKTIVE ACETYL-CoA-WEG	6
1.2.4	Cu ₂ Mo-CODHs	7
1.2.5	Ni ₂ Fe-CODHs	9
1.2.5.1	Elektronische Zustände des C-Clusters	11
1.2.5.2	Strukturen inhibierter Zustände	14
1.2.5.3	Mechanismus der CO-Oxidation	16
1.2.5.4	Physiologische Funktionen der CODHs aus <i>C. hydrogenoformans</i>	17
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	19
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
2.1	MATERIAL	20
2.1.1	CHEMIKALIEN	20
2.1.2	PUFFER, LÖSUNGEN UND MEDIEN	20
2.1.3	BAKTERIENSTÄMME UND ANTIBIOTIKA	22
2.1.4	PLASMIDKONSTRUKTE UND OLIGONUKLEOTIDE	22
2.2	METHODEN	24
2.2.1	ANOXISCHES ARBEITEN	24
2.2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.2.2.1	Klonierung von <i>cooS-IV</i>	25
2.2.2.2	Mutagenese	26
2.2.2.3	Agarose Gelelektrophorese	26
2.2.2.4	Transformation	27
2.2.2.5	Sequenzierung	27
2.2.3	BIOCHEMISCHE METHODEN	27
2.2.3.1	Heterologe Genexpression von CODH-II und CODH-IV	27
2.2.3.2	Proteinreinigung von CODH-II und CODH-IV	27
2.2.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.2.3.4	Proteinfärbung mit Coomassie	29

2.2.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.2.3.6	Messung der enzymatischen Aktivität	29
2.2.4	RÖNTGENKRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN	30
2.2.4.1	Kristallisation der CODH-II und CODH-IV	30
2.2.4.2	Manipulation von Kristallen.....	31
2.2.4.3	Datensammlung.....	32
2.2.4.4	Strukturbestimmung, Strukturverfeinerung und Evaluation	33
3	<u>ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....</u>	34
3.1	KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASE-II.....	34
3.1.1	HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG	34
3.1.2	KRISTALLISATION	35
3.1.3	ENZYM VARIANTEN DER CODH-II _{CH}	35
3.1.3.1	Wildtyp C-Cluster	36
3.1.3.2	Das Protonentransfernetzwerk der CODH-II _{CH}	38
3.1.3.3	Enzymvarianten des Gaskanals.....	45
3.1.3.4	Transformation des C-Clusters in einen [4Fe4S]-Cluster	48
3.1.4	CODH-II UND O ₂	53
3.1.4.1	Einfluss von O ₂ auf die CO-Oxidationsaktivität der CODH-II.....	53
3.1.4.2	Einfluss von O ₂ auf den C-Cluster.....	54
3.1.4.3	Der oxidierte Zustand (C _{ox}) des C-Clusters.....	59
3.1.4.4	Einfluss von O ₂ auf den CN ⁻ -gebundenen Zustand des C-Clusters.....	61
3.1.4.5	Einfluss von O ₂ auf den B- und D-Cluster	63
3.2	KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASE IV	66
3.2.1	HETEROLOGE EXPRESSION UND REINIGUNG	66
3.2.2	BESTIMMUNG DER KINETISCHEN PARAMETER.....	67
3.2.3	KRISTALLISATION DER CODH-IV	72
3.2.4	STRUKTUR DER CODH-IV	73
4	<u>SCHLUSSFOLGERUNG.....</u>	79
5	<u>AUSBLICK.....</u>	83
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	85
7	<u>ANHANG.....</u>	96
8	<u>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u>	119

1 EINLEITUNG

1.1 DIE EVOLUTION VON EISEN-SCHWEFEL PROTEINEN

Freier Sauerstoff (O_2), für uns heute ein selbstverständlicher Teil der Atmosphäre (ca. 21 %), war während der ersten Hälfte der 4.5 Mrd. Jahre dauernden Erdgeschichte nur in Spuren vorhanden. Während dieses Zeitraums könnte laut der Eisen-Schwefel-Welt Hypothese Leben in Form eines sogenannten „Pionier-Organismus“ mit einem Übergangsmetall als katalytisches Zentrum an der Oberfläche von Eisen-Schwefel-Mineralen (z.B. nahe hydrothermalen Schloten) entstanden sein. Unter Ausnutzung der hydrothermischen Energie bei hohen Temperaturen und hohem Druck könnte dieser Organismus autotrophe Kohlenstofffixierung betrieben haben (Wächtershäuser, 2007). Ein rapider Anstieg von O_2 in der Atmosphäre fand vermutlich vor ca. 2.3 Milliarden Jahren statt. Dieses Ereignis wird auch als *Great Oxidation Event* (GOE) bezeichnet und kann z.B. durch die Untersuchung roter Sedimentgesteine (Eisen(III)oxid) nachvollzogen werden (Canfield *et al.*, 2000; Holland, 2002). Verantwortlich für diese „Ökokatastrophe“ waren wahrscheinlich Cyanobakterien, welche O_2 als Abfallprodukt ihres Stoffwechsels ausschieden. Das Sauerstoffniveau stieg zunächst langsam an, da in den Weltmeeren nicht genug Phosphor vorhanden war, um den Bedarf der Cyanobakterien zu decken, sodass diese in ihrer Ausbreitung beschränkt wurden. Außerdem wurde der entstandene Sauerstoff durch die Oxidation der noch reduzierenden Umwelt abgebaut (Holland, 2006). Durch die graduelle Akkumulation von O_2 konnten sich die damals lebenden Anaerobier schrittweise an die neuen Bedingungen anpassen (Sleep und Bird, 2008). Zwei Herausforderungen mussten sie sich dabei stellen. Sauerstoff oxidiert Fe^{2+} zu Fe^{3+} , welches dann als Eisenhydroxid präzipitiert oder unlösliche Komplexe mit anionischen Salzen bildet. Die Eisenverfügbarkeit stellte daher ein Problem dar, welches durch das Ausscheiden von Chelatbildnern, die Eisen komplexieren (Siderophore), und durch die Produktion von Eisenspeicherproteinen (Ferritinen) gelöst werden konnte (Wandersman und Delepelaire, 2004). Die zweite Herausforderung war die Empfindlichkeit der Fe,S-Cluster der Mikroorganismen für O_2 und reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Zur Vermeidung des toxischen Sauerstoffs siedelten sich Mikroorganismen in anoxischen Habitaten an oder entwickelten Barrieren, welche die Fe,S-Cluster abschirmten. Es entwickelten sich auch Systeme, die Sauerstoff und reaktive Sauerstoffspezies abbauen konnten, sogenannte Sauerstoffdetoxifizierungssysteme (Imlay, 2006). Kürzliche Studien offenbarten, dass in anaeroben Organismen Fe,S-Enzyme durch

relativ sauerstoffstabile Isozyme ausgetauscht wurden, wie z.B. Fumarase C und Aconitase A in *Escherichia coli* (Liochev und Fridovich, 1992; Gruer und Guest, 1994). Die Anpassung der Mikroorganismen an die O₂-reiche Umwelt ist also noch nicht abgeschlossen und die bisherigen Forschungsergebnisse zeigen uns nur Momentaufnahmen eines fortlaufenden Evolutionsprozesses.

1.1.1 Chemie des Sauerstoffs

Sauerstoff tritt in seiner elementaren Form überwiegend als kovalentes Homodimer (O₂) auf. Dabei stellt molekularer Sauerstoff selbst eine Besonderheit dar. O₂ ist ein stabiles Diradikal mit zwei ungepaarten Elektronen in den anti-bindenden π-Orbitalen, deren Spins in die gleiche Richtung ausgerichtet sind. Aus diesem Grund können organische Moleküle, die Spin-gepaarte Elektronen haben, nicht mehr als ein Elektron auf einmal auf Sauerstoff übertragen. Sauerstoff reagiert daher nicht mit den meisten organischen Biomolekülen (z.B. Aminosäuren und Nukleinsäuren). Übergangsmetalle, welche univalente Elektronendonoren sind, werden jedoch von Sauerstoff oxidiert (Imlay, 2003). Ein Überblick über den Prozess der Sauerstoffreduktion zu Wasser und beteiligter Nebenprozesse kann Abbildung 1.1 entnommen werden.

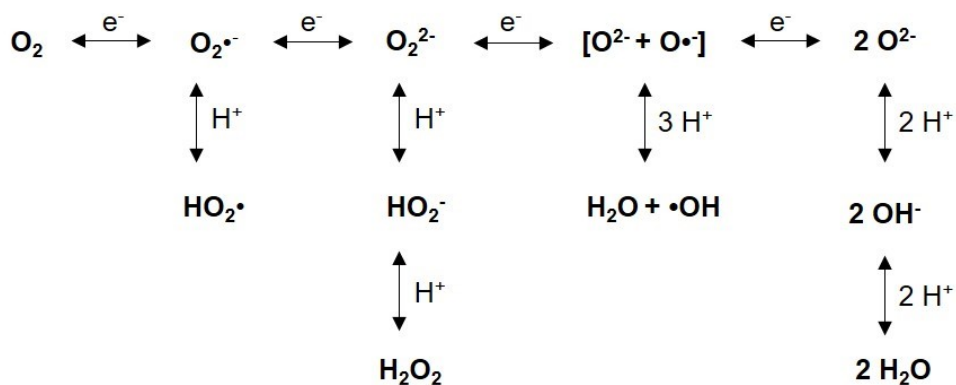
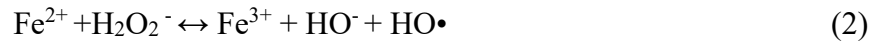


Abbildung 1.1: Übersicht über die nötigen Zwischenschritte zur Reduktion von O₂ zu H₂O und mögliche Nebenreaktionen. Verändert nach (Kaim und Schwederski, 2005).

In vitro und *in vivo* Studien zeigen, dass Flavine und Chinone Elektronen auf O₂ übertragen und so Superoxid (O₂^{•-}) bzw. Wasserstoffperoxid (H₂O₂) generieren können (Messner und Imlay, 1999; Messner und Imlay, 2002). Superoxid und Wasserstoffperoxid spielen bei der Generierung des Hydroxyl-Radikals (HO•) in der sogenannten „Fenton-Reaktion“ eine wichtige Rolle. Superoxid⁻ reduziert Fe³⁺ zu Fe²⁺ (Gl. 1). Im darauffolgenden Schritt oxidiert

das Wasserstoffperoxid Fe^{2+} , sodass ein Hydroxyl-Radikal gebildet wird (Gl. 2) (Liochev und Fridovich, 1994; Keyer und Imlay, 1996).



Superoxid, Wasserstoffperoxid und das Hydroxyl-Radikal sind reaktive Sauerstoffspezies, welche Biomoleküle schädigen können. Sowohl O_2^- als auch H_2O_2 sind jedoch in ihrer Effizienz eingeschränkt. In Bezug auf elektronenreiche Moleküle ist die Reaktivität des O_2^- durch seine anionische Ladung begrenzt. H_2O_2 wird durch seine O-O-Bindung stabilisiert. Diese Faktoren treffen nicht auf HO^\bullet zu, welches mit Raten nahe des Diffusionslimits mit den meisten Biomolekülen reagiert (Imlay, 2003).

1.1.2 Eisen-Schwefel-Proteine und Sauerstoff

Eisen-Schwefel-Proteine besitzen einen oder mehrere Fe,S-Cluster, welche bei Reduktionspotenzialen von -600 mV bis +450 mV arbeiten und verschiedene Funktionen wie Elektronentransfer, Katalyse oder Genregulation erfüllen können. Die verschiedenen Grundformen von Fe,S-Clustern sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

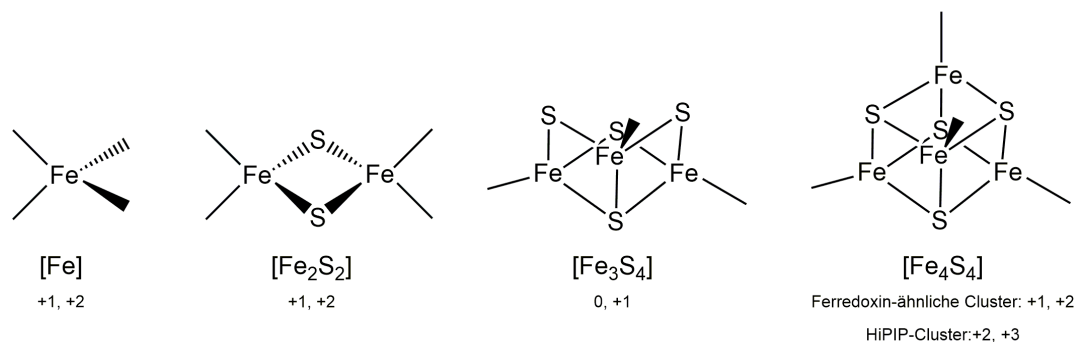


Abbildung 1.2: Grundformen von Fe,S-Clustern. Schematisch dargestellt sind der [Fe]-, [Fe₂S₂]-, [Fe₃S₄]- und [Fe₄S₄]-Cluster. Mit aufgeführt sind ihre jeweiligen stabilen Oxidationszustände. Verändert nach (Rees, 2002; Imlay, 2006).

Fe,S-Cluster enthalten in ihrer Grundform ein bis vier Eisenionen, welche typischerweise tetraedrisch durch Sulfidoliganden koordiniert werden. In Abhängigkeit von ihrer Metallzahl können Fe,S-Cluster verschiedene Oxidationsszustände annehmen. Unter der Annahme, dass Eisen als Fe^{3+} oder Fe^{2+} vorliegen kann, können Fe,S-Cluster mit n

Eisenionen theoretisch $n + 1$ Oxidationsszustände annehmen. Experimentell konnten in $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern bereits die Oxidationsszustände $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^0$ beobachtet werden. Ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{4+}$ Zustand hingegen konnte bis heute noch nicht identifiziert werden (Rees, 2002).

Fe,S-Cluster können durch reaktive Sauerstoffspezies geschädigt werden. Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster der Aconitase wirkt als Lewis-Base in Substrat-Dehydrierungs-Prozessen. Drei der vier Fe werden von Cystein-Resten koordiniert, wohingegen das katalytische Fe dem Solvens ausgesetzt ist. O_2^- oxidiert den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster zu einem instabilen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster. Der instabile $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$ -Cluster wird dann zu einem $[\text{Fe}_3\text{S}_4]^{1+}$ -Cluster abgebaut, welchem das katalytische Eisen fehlt. In ähnlicher Weise oxidiert H_2O_2 den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster (Flint *et al.*, 1993a). Die Reaktionsgeschwindigkeiten dieser Interaktionen sind sehr hoch und liegen für O_2^- bei $3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für H_2O_2 bei $4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Flint *et al.*, 1993b; Imlay, 2006). Überraschend ist die Instabilität der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, da die Cluster von Hochpotenzial $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Ferredoxinen (HiPIPs) zwischen 2+ und 3+ Zuständen wechseln können, ohne dass dies zu einem Zerfall der Cluster führt. Entscheidend ist hier, dass HiPIP-Cluster durch hydrophobe Seitenketten vom Solvens abgeschottet werden, sodass sie weder in direktem Kontakt zu Oxidationsmitteln stehen noch in ihrer oxidierten Form durch das Solvens destabilisiert werden können (Bertini *et al.*, 1997). Ferredoxine mit einem Cys-X-X-Asp-X-X-Cys-Motiv enthalten $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, die unter aeroben Bedingungen in $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Cluster umgewandelt werden. Die Mutation des zentralen Cysteins in sauerstoffunempfindlichen Ferredoxinen mit einem Cys-X-X-Cys-X-X-Cys-Motiv zu Aspartat resultierte jedoch überraschenderweise in einer O_2 -stabilen Form des Clusters. Die Konversion von $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern gestaltet sich demnach komplexer als zunächst angenommen und ist wahrscheinlich nicht nur von den Seitenketten der ersten Koordinationssphäre abhängig.

Auch der O_2 -induzierte Zerfall von $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern zu $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ -Clustern konnte beobachtet werden. Beispiele hierfür sind das Radikalenzym Biotin-Synthase (Duin *et al.*, 1997; Ugulava *et al.*, 2001; Tse Sum Bui *et al.*, 2003), das Gerüstprotein IscU (Chandramouli *et al.*, 2007), welches an der Fe,S-Cluster Synthese beteiligt ist, und die regulatorischen Proteine FNR (Zhang *et al.*, 2012), ein Fumarat-Nitrat-Reduktions-Protein, und NreB (Kamps *et al.*, 2004; Müllner *et al.*, 2008; Reinhart *et al.*, 2010), eine Histidin-Kinase. Dabei wird für FNR ein Zerfallprozess diskutiert, welcher die Ausbildung eines $[\text{Fe}_3\text{S}_4]$ -Intermediats beinhaltet (Crack *et al.*, 2008). Kristallographisch wurde kürzlich die Zerstörung des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters aus HydE, einer Maturase der Fe,Fe-Hydrogenase,

untersucht. Der Cluster wird von drei Cystein-Resten und einem Tyrosin-Rest koordiniert. Er zerfällt unter Einfluss von O_2 in einen $[Fe_2S_2]$ -Cluster welcher sich weiter zersetzt, bis schließlich die Apoform des Proteins erreicht ist (Nicolet *et al.*, 2013).

1.2 KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASEN

1.2.1 Chemie des Kohlenmonoxids

Kohlenmonoxid (CO) ist ein farb- und geruchloses Gas, welches ein ähnliches Molekulargewicht wie O_2 und N_2 hat und sich deswegen in der Atmosphäre anreichern kann. CO entsteht durch die unvollständige Verbrennung von kohlenstoffhaltigen Stoffen bei unzureichender Sauerstoffzufuhr. Für den Menschen ist CO toxisch, bestimmte Bakterien hingegen können CO als Kohlenstoff- oder Energiequelle nutzen. So wird vermutet, dass CO in der Uratmosphäre die Entwicklung des Lebens gefördert haben könnte. Die C-O Distanz von 1.06 Å (festes CO) und 1.128 Å (gasförmiges CO) stimmen mit einer C-O Dreifachbindung überein, durch welche CO formal polarisiert wird und eine negative Ladung am C und eine positive Ladung am O aufweist. Diese Polarisierung wird jedoch durch die Elektronegativität des O nahezu aufgehoben, sodass eine ungewöhnliche carbonylartige Verbindung entsteht, welche ein elektronenreiches C-Atom aufweist (Jeoung *et al.*, 2014b). Aufgrund seiner chemischen Eigenschaften bildet CO Metallcarbonyle mit π -elektronenreichen Metallen aus. CO bindet bevorzugt mit seinem HOMO des Kohlenstoffatoms Metalle. Als ungesättigter, weicher Ligand kann CO in einem Prozess, der auch als π -Rückbindung bezeichnet wird, Elektronen an das Metall abgeben und π -Elektronen des Metalls aufnehmen. Dabei gibt CO Elektronen entlang der σ -Bindung ab, sodass Elektronen vom Kohlenstoffatom entfernt werden, und nimmt Elektronen entlang der π -Bindung auf, wodurch die Elektronendichte am Kohlenstoffatom und Sauerstoffatom erhöht wird. Dies führt zu einer Polarisierung des CO-Moleküls mit einem eher positiven Kohlenstoffatom und einem eher negativen Sauerstoffatom (Abb. 1.3) (Janiak *et al.*, 2012).

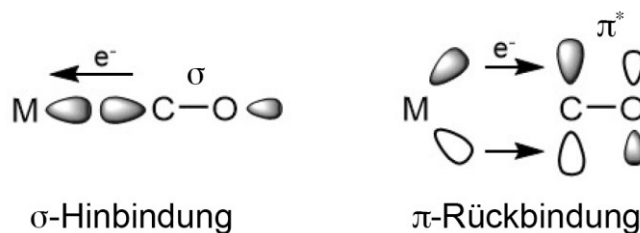


Abbildung 1.3: Bildung von Metallcarbonylen. Reproduziert nach (Janiak *et al.*, 2012).

1.2.2 Chemie des Kohlendioxids

Kohlendioxid (CO_2) ist ein lineares Molekül mit einer C-O Bindungslänge von 1.16 Å, welches 0.03 % der heutigen Atmosphäre ausmacht. CO_2 kann auch im gebundenen Zustand z.B. im Meerwasser (ca. 0.0005 %) oder als Teil von Mineralen, wie MgCO_3 und CaCO_3 , vorliegen (Holleman und Wiberg 2007). Obwohl CO_2 im Allgemeinen unpolar ist, bildet es aufgrund des Elektronegativitätsunterschieds zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff polare Bindungen aus. Es entsteht eine elektronische Struktur, die am besten als $\text{O}^{\delta-}\text{-C}^{+2\delta}\text{-O}^{\delta-}$ beschrieben werden kann und anfällig für nukleophile Attacken am Kohlenstoffatom und elektrophile Attacken an den Sauerstoffatomen ist. Dabei fungiert das Kohlenstoffatom als Lewis-Säure und die Sauerstoffatome als schwache Lewis-Basen, sodass CO_2 häufig in einer bifunktionellen Katalyse aktiviert und umgesetzt wird. Abbildung 1.4 stellt diesen Prozess dar. Bevor CO_2 reduziert werden kann, muss es zunächst aktiviert werden. Das CO_2 -Molekül bindet mit seinem Kohlenstoffatom an ein Nukleophil, sodass es zu einer Anwinkelung des CO_2 -Moleküls kommt, welche mit einer Reduktion der Bindungsordnung einhergeht. Die entstandene negative Partialladung kann durch ein Elektrophil stabilisiert werden.

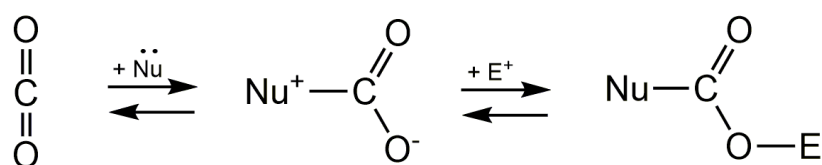


Abbildung 1.4: Aktivierung des CO_2 durch bifunktionelle Katalyse. Verändert nach (Appel *et al.*, 2013).

Generell sind Multielektron-Reduktionen gegenüber der Einzelektron-Reduktion energetisch begünstigt und erzeugen thermisch stabilere Produkte wie CO, Formiat, Formaldehyd, Methanol und Methan. Die Reduktion durch ein Elektron hingegen hat die Bildung eines Radikalanions zur Folge (Appel *et al.*, 2013).

1.2.3 Der reduktive Acetyl-CoA-Weg

Organismen haben vielfältige Wege entwickelt, um Kohlenstoff zu fixieren und als Energiequelle zu nutzen. Neben dem reduktiven Acetyl-CoA-Weg sind fünf weitere Wege zur Kohlenstofffixierung bekannt (Appel *et al.*, 2013), welche jedoch in dieser Arbeit nicht näher betrachtet werden sollen. Der reduktive Acetyl-CoA-Weg lässt sich in zwei Zweige, den Methylzweig und den Carbonylzweig unterteilen, welche genutzt werden um 2 CO_2 -Moleküle zu Acetyl-CoA zu kondensieren (Abb. 1.5). Im Methylzweig wird CO_2 zunächst

durch die Formiat-Dehydrogenase zu Formiat reduziert und bildet durch eine Kondensationsreaktion mit Tetrahydrofolat 10-Formyl-Tetrahydrofolat, welches dann über mehrere Zwischenschritte zu (6S)-5-Methyltetrahydrofolat umgewandelt wird. Die Interaktion der Methyltransferase (MeTr) mit dem corrinoide Fe,S-Protein (CoFeSP) verbindet den Methylzweig mit dem Carbonylzweig. Im Carbonylzweig ist die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) eines der Schlüsselenzyme. Sie reduziert CO_2 zu CO, welches dann durch die Acetyl-CoA-Synthase mit Coenzym A und einer Methylgruppe zu Acetyl-CoA kondensiert wird. Dabei wird die Methylgruppe durch das CoFeSP bereitgestellt (Jeoung *et al.*, 2014c).

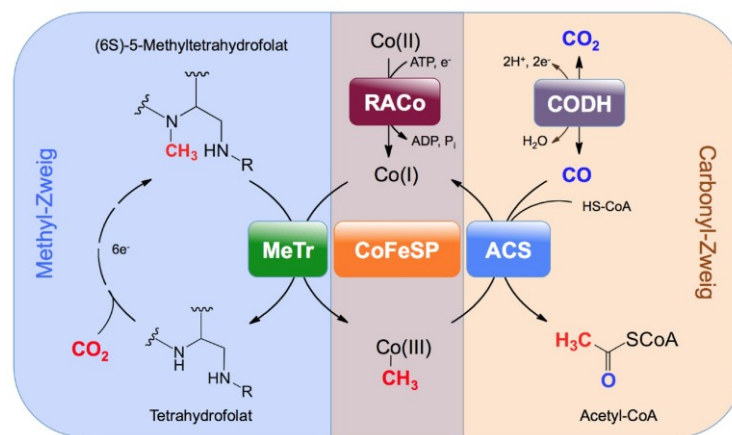
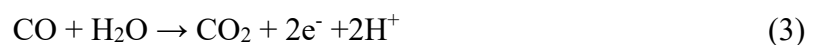


Abbildung 1.5: Der reduktive Acetyl-CoA-Weg. Schematisch sind die Interaktionen der zentralen Enzyme des reduktiven Acetyl-CoA-Wegs, die Methyltransferase (MeTr), das corrinoide Fe-S-Protein (CoFeSP), die Acetyl-CoA-Synthase (ACS), die Kohlenmonoxid-Dehydrogenase (CODH) und der reduktive Aktivator von CoFeSP (RaCo), dargestellt. Verändert nach (Jeoung *et al.*, 2014c).

1.2.4 Cu,Mo-CODHs

Cu,Mo-CODHs sind O_2 -tolerant und katalysieren die Oxidation von CO zu CO_2 (Gl. 3). Auf diesem Weg stellen sie die Versorgung carboxydotropher und carboxydovorer Mikroorganismen mit Reduktionsäquivalenten sicher.



Die Strukturen der Cu,Mo-CODH aus *Oligotropha carboxydovorans* und *Hydrogenophaga pseudoflava* konnten durch Röntgenkristallographie gelöst werden (Dobbek *et al.*, 1999; Dobbek *et al.*, 2002; Gnida *et al.*, 2003; Hänzelmann *et al.*, 2000). Mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie konnte gezielt die Struktur des aktiven Zentrums der

Cu,Mo-CODH_{oc} untersucht werden (Gnida *et al.*, 2003). Die Cu,Mo-CODH_{oc} ist ein schmetterlingsförmiger (LMS)₂-Hexamer bestehend aus drei Untereinheiten (Abb. 1.6). Das aktive Zentrum liegt in der großen Untereinheit (L, 88.7 kDa) und ist ein heterobinuklearer [CuSMo]-Cluster, welcher über das Mo an einen Molybdopterin Cytosin Dinukleotid (MCD) Kofaktor gebunden ist. Neben dem MCD-Kofaktor können in der äquatorialen Koordinationssphäre des Mo außerdem ein Oxo-Ligand und ein Sulfido-Ligand gefunden werden, welcher Mo und Cu verbindet. Ein apikal gebundener Oxo-Ligand komplettiert die Koordinationssphäre des Mo (Dobbek *et al.*, 2002). Elektronen werden vermutlich vom aktiven Zentrum über die zwei [Fe₂S₂]-Cluster der kleinen Untereinheit (S, 17.8 kDa) zu einem Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) in der mittleren Untereinheit (M, 30.2 kDa) übertragen. Von dort gehen die Elektronen in den Chinon-Speicher über (Wilcoxon *et al.*, 2011b).

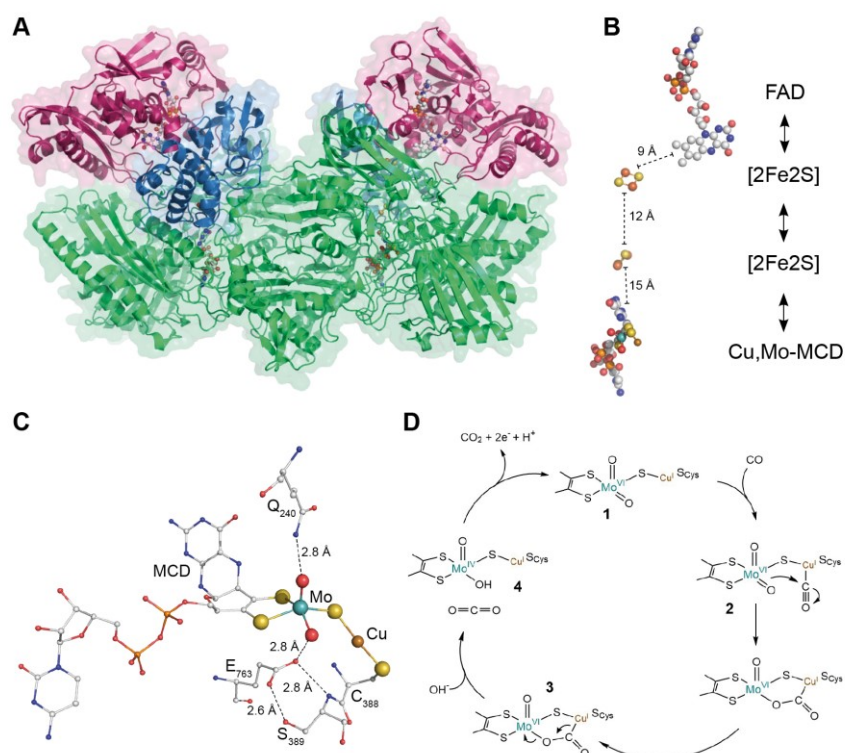
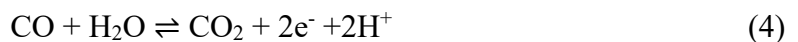


Abbildung 1.6: Struktur und Mechanismus der Cu,Mo-CODH. (A) Bändermodell des Hexamers bestehend aus zwei großen (grün), zwei mittleren (pink) und zwei kleinen Untereinheiten (blau). (B) Übersicht über die Metallzentren der Cu,Mo-CODH. Der vermutliche Weg des Elektronentransfers wird durch Pfeile visualisiert. (C) Darstellung des [CuSMo(=O)O]-Clusters und koordinierender Seitenketten (pdb-ID: 1N61) (Dobbek *et al.*, 2002). (D) Reaktionsmechanismus der CO-Oxidation: CO bindet im oxidierten Zustand des Clusters (1) an das Cu-Ion (2). Nach Umlagerung des entstandenen Intermediats (3) löst vermutlich ein Wasser die Freisetzung des CO₂ aus (4). Durch Abgabe von 2 Elektronen und 2 Protonen erreicht der Cluster wieder seinen oxidierten Zustand. Verändert nach (Jeoung *et al.*, 2014b).

Das native Enzym katalysiert die CO-Oxidation bei 25 °C mit einer Reaktionsgeschwindigkeit von 93 s⁻¹ und einem K_m von 10.7 µM, woraus sich eine katalytische Effizienz von 8.7·10⁶ M⁻¹ s⁻¹ ergibt (Zhang *et al.*, 2010). Mo wechselt während des katalytischen Zyklus zwischen den Oxidationszuständen Mo^{VI} und Mo^{IV}, wohingegen Cu als Cu^I verbleibt. Cu bindet CO und aktiviert das Molekül für den darauffolgenden nukleophilen Angriff auf den äquatorialen Oxo-Liganden des Mo. Nach Umlagerung des entstandenen Intermediats löst wahrscheinlich das Binden eines Wassers die Freisetzung von CO₂ aus. Zur Wiederherstellung des Mo^{VI} Cu^I Ausgangszustands muss der Clusters zwei Elektronen und ein Proton abgeben (Jeoung *et al.*, 2014b).

1.2.5 Ni,Fe-CODHs

Ni,Fe-CODHs katalysieren die Oxidation von CO zu CO₂ sowie die entsprechende Rückreaktion (Gl. 4). Sie lassen sich in vier Klassen einteilen. Die Klassen I und II beinhalten CODH/ACS Komplexe, welche aus fünf Untereinheiten bestehen (α, β, γ, δ, ε). Wohingegen die CODH/ACS Komplexe der Klasse III nur aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind (α, β). Die CODH/ACS Komplexe der Klassen I-III sind bifunktionell. So kann z.B. der CODH/ACS Komplex aus *Moorella thermoacetica* das durch die CODH erzeugte CO in einer Kondensationsreaktion nutzen, um Acetyl-CoA zu synthetisieren. Dabei dient das heterodimere Cobalt-Eisen-Schwefel-Protein CoFeSP als Methylgruppenträger (Gl. 5). Die homodimeren CODHs (β₂) der Klasse IV hingegen sind monofunktional und in ihrer Funktion auf die Oxidation von CO (bzw. Reduktion von CO₂) beschränkt (Lindahl, 2002).



Es konnten die Struktur der bifunktionellen CODH/ACS aus *M. thermoacetica* und die Strukturen der monofunktionalen CODHs aus *Rhodospirillum rubrum* und *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* gelöst werden (Doukov *et al.*, 2002; Drennan *et al.*, 2001; Dobbek *et al.*, 2001; Jeoung und Dobbek, 2007) (Abb. 1.7). Der CODH/ACS Komplex aus *M. thermoacetica* ist ein α₂β₂ Heterotetramer bestehend aus einem CODH Dimer (β₂) und zwei ACS α-Untereinheiten, welche jeweils an ein Ende des CODH-Dimers binden. Das CODH-Dimer enthält fünf Metallzentren (C/C', B/B', D) und ist für die

Umsetzung von $\text{CO} \leftrightarrow \text{CO}_2$ verantwortlich, welche an dem $[\text{NiFe}_4\text{S}_4\text{OH}_x]$ C-Cluster stattfindet. Der A-Cluster, ein $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, der an eine binukleare Ni,Ni-site gebunden ist, katalysiert die Synthese von Acetyl-CoA und ist Teil der α -Untereinheit. Die A- und C-Cluster des Komplexes sind über einen 138 Å langen hydrophoben Kanal miteinander verbunden, sodass ein optimaler Gasaustausch zwischen ihnen gewährleistet ist (Doukov *et al.*, 2002; Doukov *et al.*, 2008). Für CODH/ACS_{Mt} wird außerdem diskutiert, ob durch aromatische Seitenketten dynamisch geformte Gaskanäle den Transport von CO_2 sicherstellen können (Wang *et al.*, 2013a).

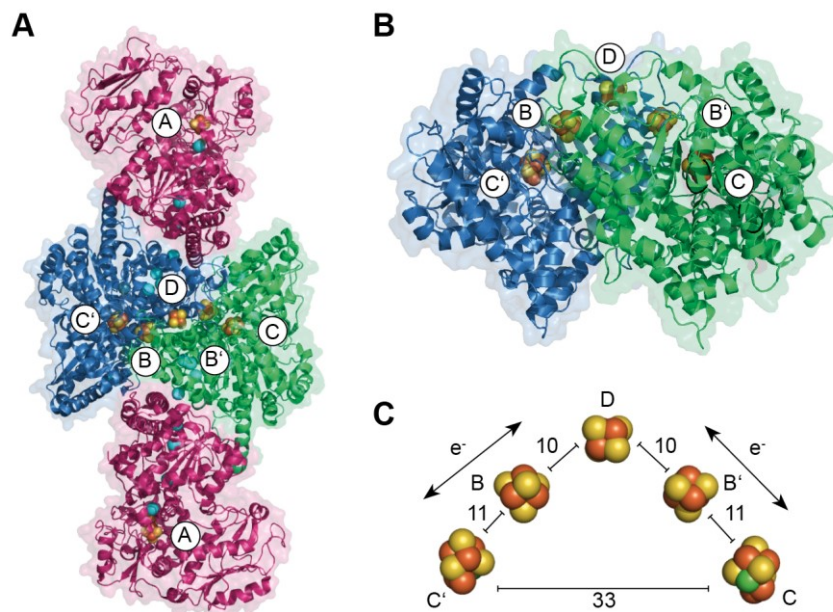


Abbildung 1.7: Strukturen der Ni,Fe-CODHs. Bändermodell der (A) bifunktionellen CODH/ACS_{Mt} (pdb-ID: 2Z8Y) (Doukov *et al.*, 2008) bestehend aus zwei α - (pink) und zwei β -Untereinheiten (blau und grün). Xenon-Atome sind blau markiert. (B) Bändermodell der monofunktionalen CODH-II_{Ch} (pdb-ID: 3B51) (Jeoung und Dobbek, 2007) bestehend aus zwei β -Untereinheiten (blau und grün). (C) Metallzentren (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb) der CODH-II_{Ch} und möglicher Elektronentransferweg. Abstände sind in Å angegeben.

Monofunktionale CODHs sind pilzförmige β_2 -Homodimere. Wie zuvor beschrieben enthalten sie fünf Metallzentren, über welche vermutlich der Elektronentransfer sichergestellt werden kann. So könnten Elektronen vom aktiven Zentrum, dem C-Cluster, über den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ B-Cluster und den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ D-Cluster auf einen externen Elektronenakzeptor, z.B. ein Ferredoxin, übertragen werden (Jeoung und Dobbek, 2007). Neben dem Transport von Elektronen muss auch der Transport von Protonen, CO/CO_2 und Wasser innerhalb des Enzyms gewährleistet werden. Protonen könnten über ein

Protonentransfernetzwerk, welches die Histidin-Reste H93, H96, H99 und H102 nutzt, zur Proteinoberfläche befördert werden (Kim *et al.*, 2004). Wasser könnte über ein Netzwerk hydrophiler Seitenketten zum C-Cluster befördert werden (Jeoung und Dobbek, 2007). Experimente mit Xenon, welches in hydrophoben Kavitäten von Proteinen bindet, deuten darauf hin, dass der Transport von CO/CO₂ auch in monofunktionalen CODHs durch Nutzung hydrophober Kanäle gewährleistet wird (Abb. 1.8) (Dobbek *et al.*, 2001; Fessler, 2015).

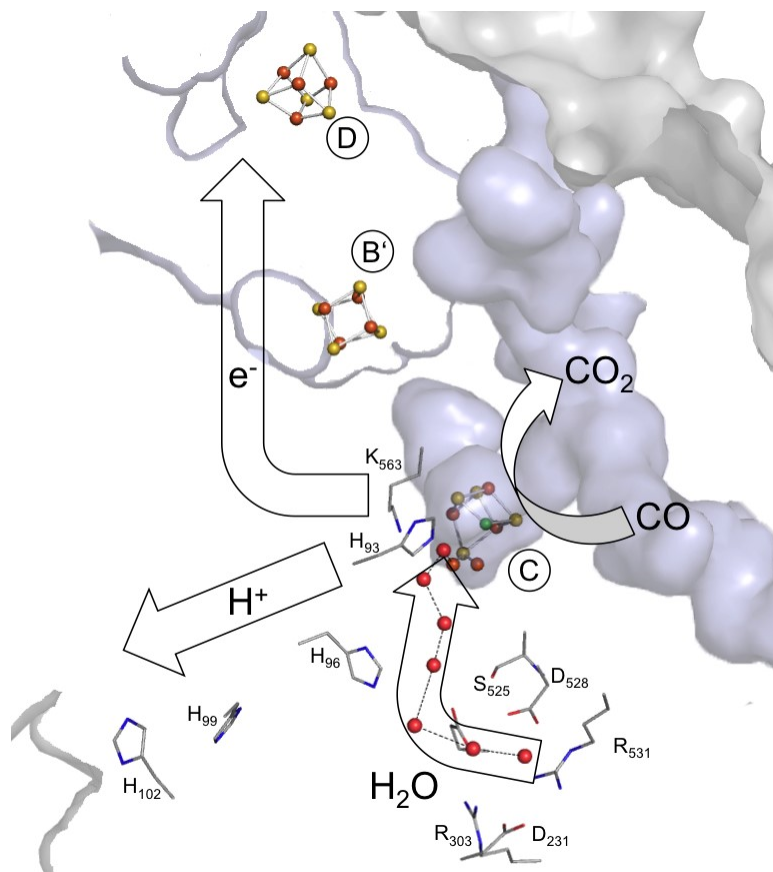


Abbildung 1.8: Substrat- und Produktkanäle in CODH-II_{Ch}. Ein hydrophober Gaskanal (blau) stellt die Versorgung mit CO bzw. den Abtransport von CO₂ sicher. Wasser (rot) wird dem C-Cluster über hydrophile Seitenketten zugeführt. Protonen verlassen den C-Cluster über ein aus Histidin-Resten bestehendes Protonentransfernetzwerk. Die Metall-Cluster (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb) bilden ein Elektronentransfersystem. Verändert nach (Jeoung *et al.*, 2014b).

1.2.5.1 Elektronische Zustände des C-Clusters

Spektroskopisch konnten vier Redoxzustände des C-Clusters identifiziert werden (C_{ox}, C_{red1}, C_{red2}, C_{int}) (Lindahl, 2002). Bei Potenzialen höher als -200 mV liegt der Cluster im katalytisch inaktiven, oxidierten C_{ox}-Zustand vor. Bei sinkenden Potenzialen wird der diamagnetische C_{ox}-Zustand mittels eines Elektrons zu dem paramagnetischen C_{red1}-Zustand

reduziert (Lindahl, 2002; Feng und Lindahl, 2004a). In CODH_{Mt} , CODH_{Rr} und CODH-I_{Ch} wurden in diesem Zustand für den C-Cluster ESR-Signale von $g_{av}=1.82$, $g_{av}=1.87$, $g_{av}=1.86$ identifiziert (Lindahl *et al.*, 1990a; Spangler *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2013b). Durch CO-Oxidation nimmt der Cluster zwei weitere Elektronen auf und erreicht den C_{red2} -Zustand. Das Mittelpunktspotenzial für die Umwandlung von C_{red1} zu C_{red2} ($E^0 \sim -530 \text{ mV}$) (Lindahl *et al.*, 1990a; Lindahl *et al.*, 1990b) ähnelt dabei dem des CO/CO_2 -Paares ($E^0 \sim -558 \text{ mV}$) (Grahame und DeMoll, 1995). Im C_{red2} -Zustand wurden für CODH_{Mt} und CODH_{Rr} ein ESR Signal von $g_{av}=1.86$ identifiziert (Lindahl *et al.*, 1990a; Spangler *et al.*, 1996). Unklar ist allerdings, wo die zwei Elektronen lokalisiert sind. So wird die Möglichkeit eines Ni^0 , eines hydridgebundenen Ni^{2+} oder einer dativen Ni-Fe-Bindung diskutiert (Lindahl, 2002; Amara *et al.*, 2011; Lindahl, 2012). Wird ein Elektron über intramolekularen Elektronentransfer an den B-Cluster übertragen, bildet sich der C_{int} -Zustand aus, welcher keinerlei paramagnetisches Signal aufweist (Fraser und Lindahl, 1999). Durch Abgabe eines weiteren Elektrons kehrt der Cluster wieder in den C_{red1} -Zustand zurück (Abb. 1.9).

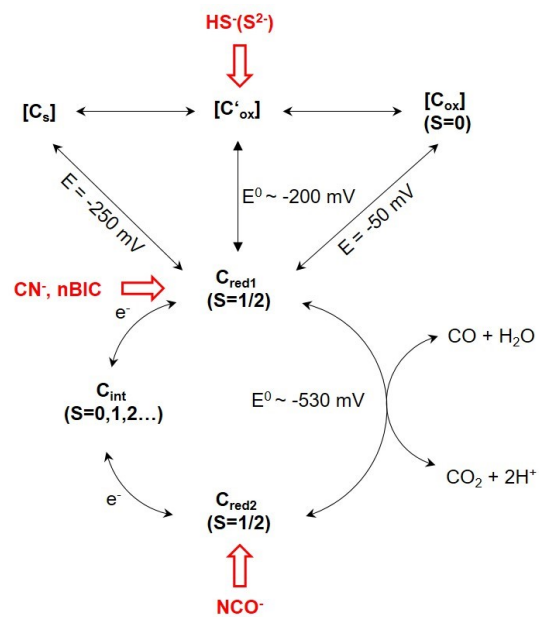


Abbildung 1.9: Redoxzustände des C-Clusters. Dargestellt sind die verschiedenen Redoxzustände des C-Clusters (Spinzustände sind in Klammern angegeben) und ihre jeweiligen Inhibitoren (rot). Verändert nach (Wang *et al.*, 2013b; Jeoung *et al.*, 2014a).

Die Identifikation der verschiedenen Redoxzustände des C-Clusters wurde auch durch kristallographische Studien unterstützt. Im Jahr 2007 konnte der Aufbau des C_{red1} - und C_{red2} -Zustands der CODH-II_{Ch} aufgeklärt werden (Jeoung und Dobbek, 2007). Zur

Erzeugung des C_{red1} - und C_{red2} -Zustands wurden die Reduktionsmittel DTT bzw. Ti^{3+} -Citrat verwendet, welche einen Zustand von -320 mV (C_{red1}) bzw. -600 mV (C_{red2}) erzeugen (Abb. 1.10).

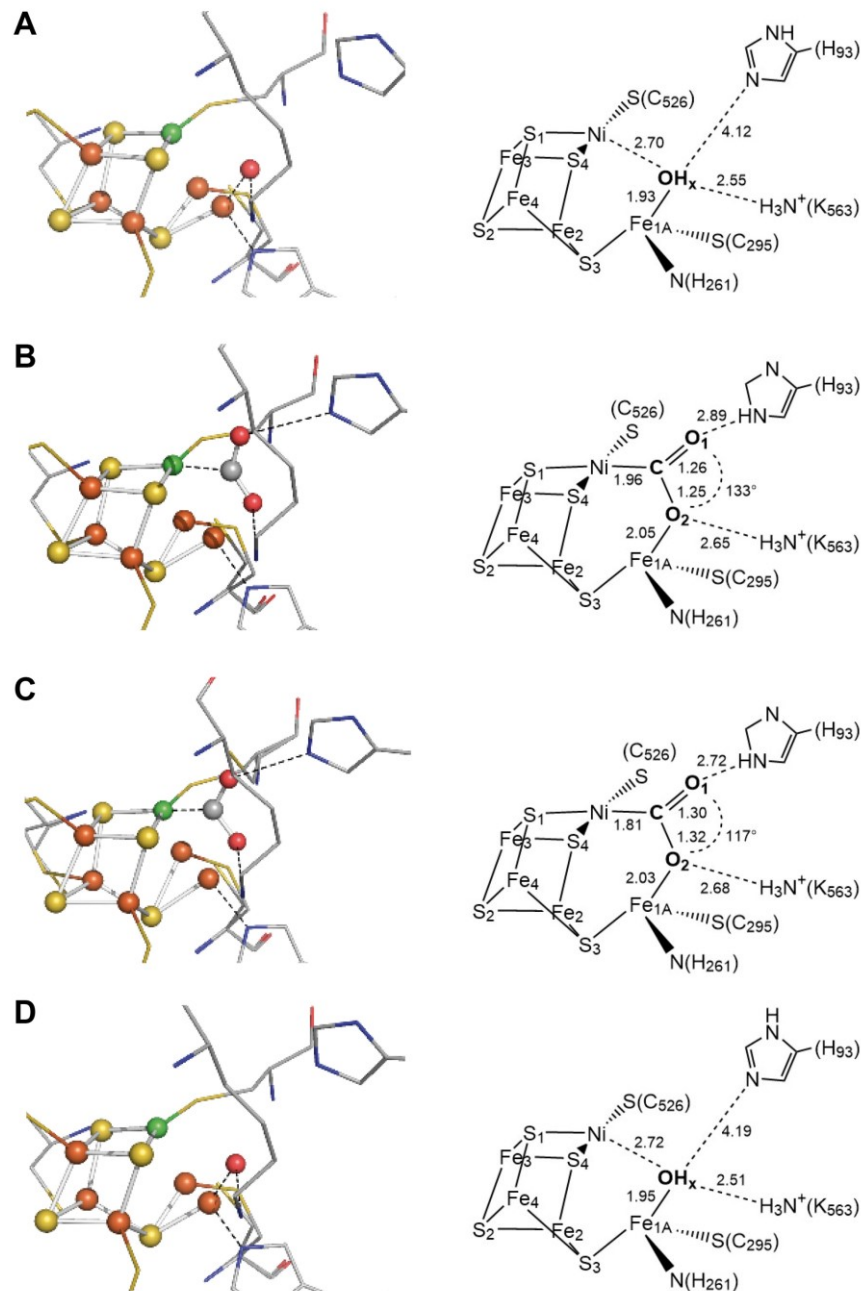


Abbildung 1.10: Struktur des C-Clusters der CODH-II_{Ch}. (A) -600 mV-Zustand (pdb-ID: 3B51) (Jeoung und Dobbek, 2007). (B) CO₂-gebundener -600 mV-Zustand (pdb-ID: 3B52) (Jeoung und Dobbek, 2007). (C) CO₂-gebundener -600 mV-Zustand bei atomarer Auflösung (pdb-ID: 4UDX) (Fessler *et al.*, 2015). (D) -320 mV-Zustand (pdb-ID: 3B53) (Jeoung und Dobbek, 2007).

Im -320 mV-Zustand wurde der C-Cluster als ein $[NiFe_4S_4OH_x]$ -Cluster identifiziert und besteht aus einem verzerrt kubanen $[NiFe_3S_4]$ -Kern, welcher von vier Cystein-Resten koordiniert wird, und einem *exo*-Fe (Fe₁), welches durch einen Cystein- und einen Histidin-

Rest koordiniert wird. Das *exo*-Fe besetzt zwei Positionen, nämlich die stärker ausgeprägte Fe_{1A}-Position (50%) und die schwächer ausgeprägte Fe_{1B}-Position (30%). Es bindet einen OH_x-Liganden, welcher sich in einem Abstand von 2.7 Å zum Ni befindet. Mössbauer-Spektren bestätigten die Existenz des *exo*-Fe (Hu *et al.*, 1996). Durch ENDOR-Spektroskopie konnte zudem die Bindung eines Wasser- oder Hydroxo-Liganden an das *exo*-Fe gezeigt werden (DeRose *et al.*, 1998). Auch im -600 mV-Zustand konnte die Existenz eines OH_x-Liganden, welcher mit dem *exo*-Fe verbrückt ist, festgestellt werden. Der Abstand zum Ni beträgt hier 2.72 Å. Durch Behandlung der Kristalle im -600 mV-Zustand mit NaHCO₃-Lösung (unter Umsatzbedingung) wurde der -600 mV + CO₂-Zustand erzeugt. Es konnte ein [NiFe₄S₄-CO₂]-Cluster identifiziert werden, in welchem CO₂ das Ni und das *exo*-Fe über eine $\mu_2\text{-}\eta^2$ -Koordinationsgeometrie verbrückt. Dabei weist das gebundene CO₂ einen O₁-C-O₂-Winkel von 133° auf und wird durch die Seitenketten H93 und K563 stabilisiert (Jeoung und Dobbek, 2007). Kürzlich wurde eine weitere Struktur der CODH im -600 mV + CO₂-Zustand gelöst. Die atomare Auflösung der Struktur erlaubte eine Verfeinerung ohne *restraints*, sodass Bindungslängen und Winkel exakt bestimmt werden konnten. Die Verkleinerung des O₁-C-O₂-Winkels (117°) und die Verkürzung der Ni-C-Bindung (1.8 Å) weisen auf eine stärkere reduktive Aktivierung des CO₂ hin. Es handelt sich vermutlich nicht wie zunächst angenommen um ein anionisches Radikal (CO₂^{•-}), sondern um eine Carboxylatgruppe (-COO⁻) (Fessler *et al.*, 2015).

1.2.5.2 Strukturen inhibierter Zustände

Lange Zeit war die Struktur der aktiven CODH umstritten. Strukturen der CODH_{Ch} zeigten einen verbrückenden Sulfido-Liganden zwischen dem *exo*-Fe und dem Ni (Dobbek *et al.*, 2001), welcher jedoch nicht in den Strukturen der CODH_{Rr} und CODH_{Mt} identifiziert werden konnte (Drennan *et al.*, 2001; Doukov *et al.*, 2002). So wurde die Funktion des Sulfids als Aktivator (Dobbek *et al.*, 2004) bzw. Inhibitor (Feng und Lindahl, 2004b) diskutiert. Diese Diskussion wurde erst im Jahr 2007 aufgelöst, als die Struktur einer aktiven CODH_{Ch} gelöst wurde, welche keinen verbrückenden Sulfido-Liganden aufwies (Jeoung und Dobbek, 2007) (Abb. 1.11). Durch elektrochemische Studien konnte dann die Rolle des Sulfids als Inhibitor näher beleuchtet werden. So bindet Sulfid erst bei Potenzialen über -50 mV. Zur Reaktivierung muss jedoch ein Potenzial von mindestens -250 mV angelegt werden. Sulfid inhibiert dementsprechend die CO-Oxidation, jedoch nicht die CO₂-Reduktion. Es wurde zudem ein intermediärer C'_{ox}-Zustand vorgeschlagen, welcher in einen leichter

reaktivierbaren C_{ox} -Zustand oder in den Sulfid-gebundenen C_s -Zustand übergehen kann (Wang *et al.*, 2013b).

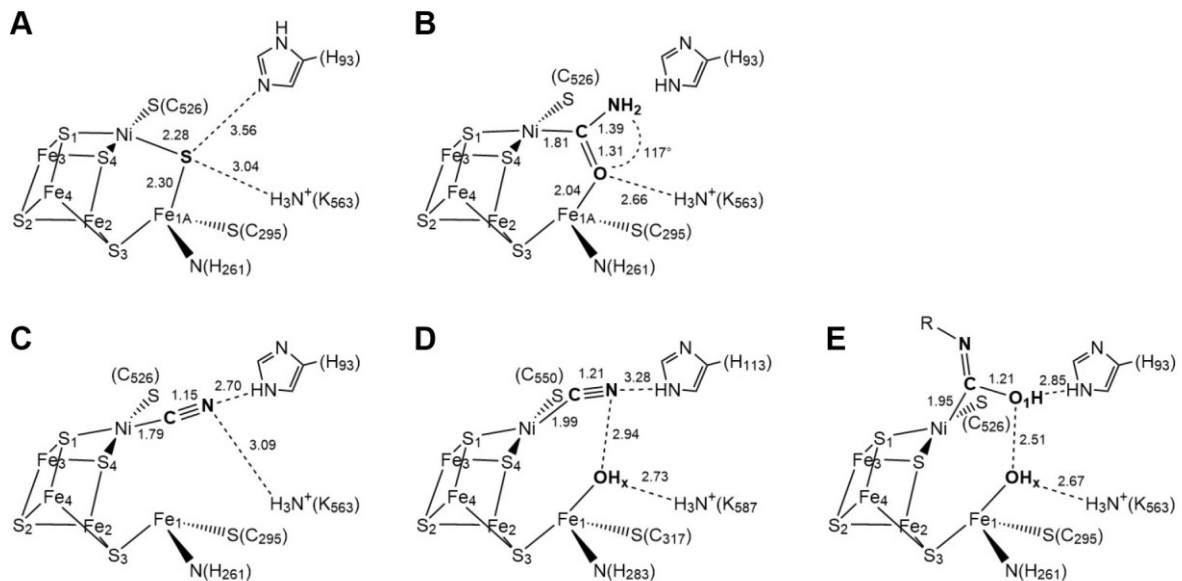


Abbildung 1.11: Inhibierte Zustände der CODH. (A) Sulfid-inhibierte CODH_{Ch} (pdb-ID: 1SU6) (Dobbek *et al.*, 2004) (B) Cyanat-inhibierte CODH_{Ch} (pdb-ID: 4UDY) (Fessler *et al.*, 2015) (C) Cyanid-inhibierte CODH_{Ch} (pdb-ID: 3I39) (Jeoung und Dobbek, 2009) (D) Cyanid-inhibierte CODH/ACSM_t (pdb-ID: 3I04) (Kung *et al.*, 2009) (E) n-Butylisocyanat-gebundene CODH_{Ch} (pdb-ID: 2YIV) (Jeoung und Dobbek, 2012).

Die Bindungsweise des CO konnte durch die Aufklärung CN^- -gebundener Strukturen näher beleuchtet werden. CN^- ist ein isoelektronisches CO Analogon. Es bindet im C_{red1} -Zustand und inhibiert so die CO-Oxidation (Lindahl, 2002). Diese Inhibition kann unter reduzierenden Bedingungen unter Zugabe von Substrat (CO/CO_2) wieder aufgehoben werden (Ensign *et al.*, 1989; Anderson und Lindahl, 1996; Ha *et al.*, 2007). Überraschenderweise zeigten die Strukturen der CODH_{Mt} und CODH_{Ch} verschiedene Bindungsmodi des CN^- . In CODH_{Mt} komplettiert CN^- die verzerrt tetraedrale Koordination des Ni, indem es in einer abgewinkelten Koordination an das Ni bindet (Ni-C-N-Winkel: 114°). Der ungewöhnliche Bindungswinkel wurde durch den Einfluss des konservierten Isoleucin-Rests I567 erklärt, welcher eine lineare, apikale Bindung verhindern könnte (Kung *et al.*, 2009). Eine gleichzeitig veröffentlichte Struktur der CODH_{Ch} zeigte jedoch die Bindung des CN^- in nahezu linearer Konformation an die apikale Koordinationsstelle des Ni (Ni-C-N-Winkel: 170°). Dabei geht der OH_x -Ligand verloren und die Besetzung des *exo*-Fe verschiebt sich zu dessen alternativer B-Position (Jeoung und Dobbek, 2009). *Steady-state* Kinetiken zeigten, dass CN^- als ein langsam-bindender

Inhibitor wirkt (Ensign *et al.*, 1989). Dementsprechend könnte CN^- zunächst schnell an das Ni binden und sich dann in eine stabilere Konformation umlagern (Jeoung und Dobbek, 2009).

Die Reaktivität des Clusters konnte durch die Inkubation von CODH_{Ch} mit n-Butylisocyanid (nBIC), einem CO Analogon, und Cyanat (NCO^-), einem CO_2 Analogon, genauer betrachtet werden. nBIC bindet im C_{red1} -Zustand und ist ein kompetitiver Inhibitor der CO-Oxidation mit einem K_i von 1.66 mM. Die Oxidation von nBIC zu n-Butylisocyanat ist etwa 10^5 mal langsamer als die Oxidation von CO zu CO_2 (Kumar und Ragsdale, 1995). Dabei reagiert nBIC mit dem OH_x -Liganden des *exo*-Fe und bringt so einen n-Butylisocyanat-gebundenen C-Cluster hervor (Jeoung und Dobbek, 2012). NCO^- bindet im C_{red2} -Zustand und kann zu CN^- reduziert werden (Wang *et al.*, 2013b; Ciaccafava *et al.*, 2017). Kürzlich wurde die Struktur der NCO^- -gebundenen CODH gelöst, deren Bindungslängen und -winkel auf die Ausbildung eines Ni-Carbamoyls hindeuten (Fessler *et al.*, 2015).

1.2.5.3 Mechanismus der CO-Oxidation

Die CODH-II aus *C. hydrogenoformans* katalysiert bei 70 °C die Oxidation von CO mit einem k_{cat} von bis zu 31000 s^{-1} und einem K_m für CO von 18 μM (k_{cat}/K_m : $1.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Sie nähert sich mit dieser Geschwindigkeit dem Diffusionslimit und zählt daher zu den „katalytisch perfekten Enzymen“ (Alberty und Hammes, 1958; Bar-Even *et al.*, 2015). Die Katalyse der Rückreaktion ist mit einem k_{cat} im Bereich von $10 - 45 \text{ s}^{-1}$ und einem K_m für CO_2 von 8 mM signifikant langsamer (Wang *et al.*, 2013c). CO bindet im C_{red1} -Zustand (**1**) an die offene Koordinationsstelle des Ni. Dabei kann CO zunächst apikal an das Ni binden und sich daraufhin in die äquatoriale Ebene umlagern oder direkt in der äquatorialen Ebene an das Ni binden. Der Histidin-Rest H93 stabilisiert das gebundene CO und erhöht die Polarisierung des Ni-gebundenen Carbonyls, sodass es für den nukleophilen Angriff des OH_x -Liganden vorbereitet ist (**2**). Das resultierende Carboxylat verbrückt Fe_1 und Ni und komplettiert so die quadratisch-planare Koordination des Ni. Der Lysin-Rest K563 und der protonierte Histidin-Rest H93 stabilisieren diesen Zustand (**3**). Die Zugabe eines Wassers könnte die Freisetzung von CO_2 und zwei Protonen erleichtern und so den zwei Elektronen reduzierten C_{red2} -Zustand, in welchem Wasser an das Fe_1 bindet, erzeugen (**4**). Der C_{red1} -Ausgangszustand wird erreicht, indem der C-Cluster die putative Elektronentransferkette nutzt und zwei Elektronen auf den B-Cluster transferiert (Jeoung *et al.*, 2014b) (Abb. 1.12).

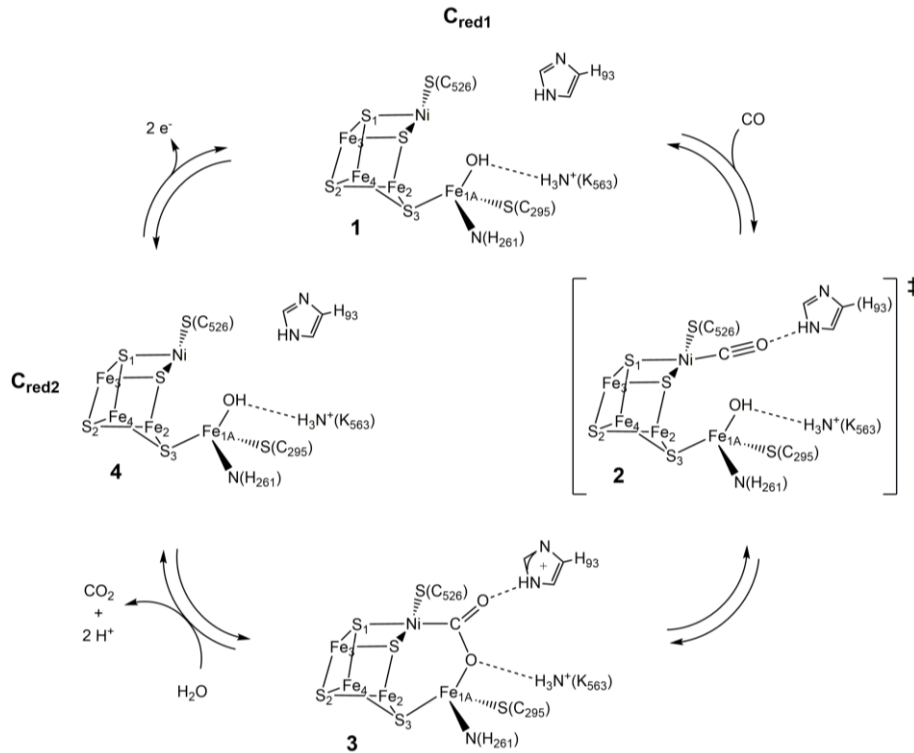


Abbildung 1.12: Mechanismus der CO-Oxidation am C-Cluster der CODH-II_{Ch}. Im C_{red1}-Zustand bindet ein Hydroxyl-Ligand an das Fe₁ (1). CO bindet an das Ni und vervollständigt dessen quadratisch planare Koordination. Es bildet sich ein transienter Zustand aus, welcher durch H₉₃ stabilisiert wird (2). Der nukleophile Angriff des Hydroxyl-Liganden erzeugt als Produkt CO₂, welches das Ni und Fe₁ verbrückt (3). Die Freisetzung des CO₂ wird durch ein Wassermolekül veranlasst (4). Durch Abgabe von zwei Elektronen geht der Cluster wieder in den C_{red1}-Zustand über. Verändert nach (Jeoung *et al.*, 2014b)

1.2.5.4 Physiologische Funktionen der CODHs aus *C. hydrogenoformans*

C. hydrogenoformans ist ein anaerobes, thermophiles Bakterium, welches CO als Kohlenstoff- und Elektronenquelle nutzt und dabei H₂ und CO₂ erzeugt. Das hydrogenogene Bakterium wurde erstmalig aus einer heißen Quelle der Insel Kunaschir (Russland) isoliert (Svetlichny *et al.*, 1991). Die Analyse der genomischen Sequenz von *C. hydrogenoformans* erlaubte die Identifikation von fünf Genomsequenzen (*cooS*-I-V), welche potenzielle CODHs kodieren (Wu *et al.*, 2005). Die Zahl kodierter CODHs ist ungewöhnlich, da die meisten CO-nutzenden Organismen eine oder maximal zwei CODHs aufweisen. CODHs aus *C. hydrogenoformans* könnten daher vielfältige zellulären Funktionen haben. Durch Betrachtung der Lokalisation der *cooS* Gene und zahlreiche *in vitro* Studien konnte Einblick in die verschiedenen möglichen Funktionen gewonnen werden. Abbildung 1.13 zeigt eine Übersicht über die genomische Lokalisation der fünf CODH-kodierenden Gene.

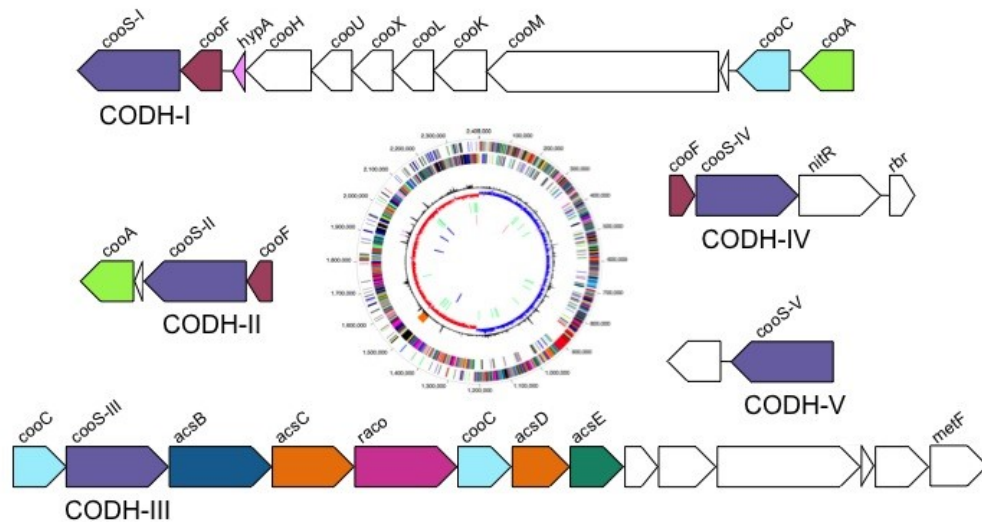


Abbildung 1.13: Genomische Lokalisation der fünf CODH-Gencluster aus *C. hydrogenoformans*. Verändert nach (Wu *et al.*, 2005).

CooS-I befindet sich unterhalb eines Hydrogenase-Genclusters (*cooMKLXUH*) und der Sequenz eines Elektronentransferproteins (*cooF*). Es wird angenommen, dass diese acht Enzyme *in vivo* einen membrangebundenen Komplex bilden, welcher CO zu CO₂ oxidiert und dabei H₂ umsetzt (Svetlitchnyi *et al.*, 2001; Soboh *et al.*, 2002). In *R. rubrum* wurde ein homologer CODH/Hydrogenase-Komplex identifiziert, welcher Energie in Form eines Protonengradienten entlang der Zellmembran speichert (Fox *et al.*, 1996). CODH-II konnte als Homodimer isoliert werden und liegt wie CODH-I membrangebunden vor. *In vitro* Studien zeigten, dass es an der Bereitstellung von NADPH beteiligt sein könnte (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). In *M. thermoacetica* spielt die bifunktionelle CODH/ACS eine wichtige Rolle bei der Kohlenstofffixierung. Diese CODH/ACS wird in einem *acs* Operon kodiert, welches dem *cooS-III* Gencluster ähnelt, sodass eine ähnliche Funktion der CODH-III angenommen werden kann (Svetlitchnyi *et al.*, 2004).

Als anaerober Organismus benötigt *C. hydrogenoformans* effektive Mechanismen zur Sauerstoffdetoxifizierung. CODH-IV (*cooS-IV*) könnte an der oxidativen Stressantwort beteiligt sein. Das *cooS-IV*-Gen liegt in einem Gencluster, welches neben einem *CooF*-Gen (Ferredoxin) auch Gene enthält, die für ein Rubrerythrin (*rbr*) und eine FAD-enthaltende Oxidoreduktase (*nitR*) kodieren. Elektronen könnten von CODH-IV über das Ferredoxin und die Oxidoreduktase auf Rubrerythrin übertragen werden, um reaktive Sauerstoffspezies zu detoxifizieren (Wu *et al.*, 2005; Fessler, 2011).

Die Funktion der CODH-V (*cooS-V*) kann nicht aus ihrem genomischen Umfeld erschlossen werden. Die zwei Gene welche sich in Leserichtung von *cooS-V* befinden, kodieren für

einen mechanosensitiven Ionenkanal (*mscS*) und für ein GTP-abhängiges Nukleinsäurebindeprotein (*xchF*). In phylogenetischen Analysen clustert das *cooS*-V-Gen zudem nicht mit den bereits charakterisierten CODHs aus *C. hydrogenoformans* und *M. thermoacetica*, sondern bildet eine Gruppe mit bisher nicht charakterisierten CODHs (Wu *et al.*, 2005; Matson *et al.*, 2011). Kürzlich konnte die Struktur der CODH-V gelöst werden. Im *as isolated* Zustand zeigt sie einen $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2]$ -Cluster, welcher durch Reduktion in einen $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$ -Cluster überführt werden kann. Damit weist sie Ähnlichkeiten zu Hybrid-Cluster Proteinen (HCPs) auf und ist möglicherweise ein evolutionäres Bindeglied zwischen HCPs und CODHs. Die CODH-V kann weder CO noch CO_2 umsetzen. Wie HCPs ist sie jedoch in der Lage Hydroxylamin zu reduzieren. Die niedrige Umsatzrate (0.13 s^{-1}) lässt allerdings darauf schließen, dass es sich hier nicht um die physiologische Funktion der CODH-V handelt (Fessler, 2015).

1.3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

In dieser Arbeit sollen zwei Themengebiete betrachtet werden. Im ersten Teil der Arbeit soll der Mechanismus der CO-Oxidation der CODH-II_{Ch} untersucht werden. Zwar konnten in vorigen Studien bereits diverse Seitenketten identifiziert werden, die für die CO-Oxidation relevant sind, die genaue Bedeutung dieser blieb jedoch unklar, da eine strukturelle Untersuchung der Enzymvarianten fehlte (Spangler *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2013). In dieser Arbeit soll daher die kinetische Untersuchung der Enzymvarianten mit einer Strukturanalyse kombiniert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit soll der Einfluss von O_2 auf CODHs näher beleuchtet werden. So werden CODHs durch Sauerstoff inaktiviert (Drake, 1982; Bonam *et al.*, 1984; Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Der Mechanismus der Inaktivierung ist jedoch nicht geklärt. Als Modellenzym soll hier CODH-II_{Ch} dienen, für welches die Expressions- und Kristallisationsbedingungen bereits etabliert sind. Auch CODH-IV_{Ch} soll hier näher betrachtet werden, da für dieses Enzym angenommen wird, dass es aufgrund der genomischen Lokalisation des *cooS*-IV_{Ch} Gens an der oxidativen Stressantwort von *C. hydrogenoformans* beteiligt ist (Wu *et al.*, 2005).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von den Firmen *Acros Organics* (Geel, Belgien), *AppliChem* (Darmstadt), *Biorad* (München), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) und *Sigma-Aldrich* (Deisenhofen) bezogen und hatten mindestens analytischen Reinheitsgrad. Wasser wurde vor Verwendung durch eine Reinstwasseranlage (Merck, Millipore, Darmstadt) gereinigt. N₂ (99.99 %), N₂/H₂ (95/5 %), CO (99.99 %) und O₂ (99.5 %) wurden von der Firma *Air Liquide* (Berlin) bezogen.

Sämtliche Materialien zur Chromatographie wurden durch die Firma *GE Healthcare* bereitgestellt.

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 2.1: Puffer zur Agarosegelelektrophorese.

TAE-Laufpuffer (50x)	2 M Tris, 5.7 % (v/v) ml Eisessig, 0.05 M EDTA
Ladepuffer (6x)	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin

Tabelle 2.2: Puffer zur Proteinreinigung.

Lysispuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Saccharose, 1 % Desoxycholsäure (DCA), 2 mM DT
Waschpuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 2 mM DT
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 2 mM DT
Lagerungspuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DT, 2 mM DTT
TEV-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM 2-Mercaptoethanol

Tabelle 2.3: Puffer zur SDS-Acrylamidgelelektrophorese.

Laufpuffer (10x)	1.92 M Glycin, 0.25 M Tris, 0.1 % (w/v) SDS
Ladepuffer (6x)	200 mM Tris-HCl pH 6.5, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 400 mM DTT

Tabelle 2.4: Zusammensetzung denaturierender Proteingele.

Sammelgel	12 % (w/v) Acrylamid (Acrylamid-Bisacrylamid- Stammlösung im Verhältnis 37.5:1, Roth), 375 mM Tris (pH 8.8), 0.1 % (w/v) SDS, 0.08 % (v/v) TEMED, 0.05 % (w/v) APS
Trenngel	6 % Acrylamid, 125 mM Tris (pH 6.8), 0.1 % (w/v) SDS, 0.08 % TEMED

Tabelle 2.5: Lösungen zur Coomassie-Färbung.

Färbelösung	0.3 mM CBB G250, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure

Tabelle 2.6: Puffer zur Messung der enzymatischen Aktivität.

Puffer MH	50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 20 mM Methylviologen _{ox} , 2 mM DTT
Puffer MP	50 mM K-Phosphat pH (7.0), 20 mM Methylviologen _{ox} , 2 mM DTT
Puffer pH 5.5	50 mM MES-NaOH (pH 5.5), 20 mM Methylviologen, 2 mM DTT
Puffer pH 6.0	50 mM MES-NaOH (pH 6.0), 20 mM Methylviologen, 2 mM DTT
Puffer pH 7.0	50 mM HEPES-NaOH (pH 7.0), 20 mM Methylviologen, 2 mM DTT
Puffer pH 8.0	50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 20 mM Methylviologen, 2 mM DTT
Puffer pH 9.0	50 mM Tris-HCl (pH 9.0), 20 mM Methylviologen, 2 mM DTT
Puffer NAD ⁺	50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 5 mM NAD ⁺ , 2 mM DTT
Puffer NADP ⁺	50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0), 5 mM NADP ⁺ , 2 mM DTT
Puffer MR	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM Ti ³⁺ -Citrat-Lösung
Puffer MA	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DT, 2 mM DTT

Tabelle 2.7: verwendete Medien.

LB Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
LB Agar	10 g/l Trypton, 5 g /l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar
SOB-Medium	26.5 g/l SOB-Medium (Roth)
mTB-Medium	12 g/l Trypton, 24 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 11 g/l, 87 % (v/v) Glycerol, 1x Phosphatpuffer
Phosphatpuffer (10x)	123 g/l K ₂ HPO ₄ , 22 g/l KH ₂ PO ₄

2.1.3 Bakterienstämme und Antibiotika

In dieser Arbeit wurden die Bakterienstämme *E. coli* NEB5 α und *E. coli* Rosetta 2 (DE3) verwendet. *E. coli* NEB5 α diente als Klonierungsstamm. Zur heterologen Expression wurde ein modifizierter *E. coli* Rosetta 2 (DE3) Stamm verwendet, welcher das pISC-Plasmid (Nakamura *et al.*, 1999) enthielt (Tab. 2.8).

Tabelle 2.8: verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Abgeleitet von	Genotyp	Antibiotikaresistenz
<i>E. coli</i> NEB5 α	<i>E. coli</i> K12	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1 t</i> <i>hi-1 hsdR1</i>	-
<i>E. coli</i> Rosetta 2 (DE3)	<i>E. coli</i> BL21	<i>F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm</i> (DE3) <i>pRARE2</i> (<i>CamR</i>)	Chloramphenicol

Antibiotika wurden den Kulturmedien in folgender Endkonzentration zugefügt:

Chloramphenicol (Cam)	50 μ g/ml
Kanamycin (Kan)	50 μ g/ml
Tetracyclin (Tet)	12.5 μ g/ml

2.1.4 Plasmidkonstrukte und Oligonukleotide

Für diese Arbeit wurden die Plasmide pPKS2 und pPKS4, welche für die CODH-II bzw. CODH-IV aus *C. hydrogenoformans* kodieren, verwendet. Sowohl das pPKS2-Plasmid als auch diverse Mutationen des pPKS2-Plasmids wurden bereits in vorigen Arbeiten erstellt (Jeoung, 2008; Fessler, 2015) (Tab. 2.9).

Tabelle 2.9: verwendete Plasmidkonstrukte.

Bezeichnung	Gen	Mutation	Vektor	Antibiotika- resistenz	Anmerkung
pPKS2	<i>cooS</i> -II	-	pET28a (Novagen)	Kan	Zur Verfügung gestellt von Dr. Jae-Hun Jeoung (Jeoung, 2008)
pPKS2-H96D	<i>cooS</i> -II	H96D	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-H93A	<i>cooS</i> -II	H93A	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-H93E	<i>cooS</i> -II	H93E	pET28a (Novagen)	Kan	Zur Verfügung gestellt von Dr. Jochen Fessler
pPKS2-K563A	<i>cooS</i> -II	K563A	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2- K563A-H93A	<i>cooS</i> -II	K563A, H93A	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-C295D	<i>cooS</i> -II	C295D	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-K563H	<i>cooS</i> -II	K563H	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-I567A	<i>cooS</i> -II	I567A	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-I567L	<i>cooS</i> -II	I567L	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS2-I567T	<i>cooS</i> -II	I567T	pET28a (Novagen)	Kan	
pPKS4	<i>cooS</i> -IV	-	pET28a (Novagen) mit zusätzlicher TEV- Schnittstelle	Kan	
pRKISC	<i>iscS</i> <i>iscU</i> <i>iscA</i> <i>hscB</i> <i>hscA fdx</i>	-	pRK415	Tet	(Nakamura <i>et al.</i> , 1999)

Sämtliche verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg) synthetisiert und geprüft. Die einzelnen Sequenzen sind Tabelle 2.10 zu entnehmen. Mutierte Basen sowie Schnittstellen wurden markiert. Oligonukleotide, welche

für die Mutation einzelner Aminosäuren benötigt wurden, wurden mit Hilfe des Programmes *PrimerX* (Lapid und Gao, 2010) entworfen.

Tabelle 2.10: verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'-3')
C295D_v	GTGGTAGGTATTTGT G ATACGGGCAACGAGG
C295D_r	CCTCGTTGCCCCGTAT C ACAAATACCTACCAC
I567A_v	TGAAAAGGCTGTTGCC G CAGGCACCTGGGCCGTAA
I567A_r	TTACGGCCCAGGT G CCTGCGGCAACAGCCTTTTCA
I567L_v	CATGAAAAGGCTGTTGCCCTCGGCACC
I567L_r	GGTGCCGA G GGCAACAGCCTTTTCATG
I567T_v	CATGAAAAGGCTGTTGCCACCGGCACCTG
I567T_r	CAGGTGCC G TGGCAACAGCCTTTTCATG
K563H_v	GAAGCCATGCATGAACACGCTGTTGCCATCGGC
K563H_r	GCCGATGGCAACAGC G TGTTTCATGCATGGCTTC
S4_NdeI_v	GGCGCATAT G GATAAAAGCAAATTATCG
S4_XhoI_r	CGCT C GAGCTAAAGGTTTAACAAAGCCC

2.2 METHODEN

2.2.1 Anoxisches Arbeiten

Proteinreinigungen und Kristallisationsexperimente erfolgten in anoxischen Handschuhkästen (*model B*, COY Laboratory, Michigan, USA) unter einer Atmosphäre von 95 % N₂, 5 % H₂. Puffer und Lösungen wurden in Flaschen gefüllt, welche mit Butylgummisepten und einem Schraubverschluss bzw. einer Aluminium *Crimp*-Kappe verschlossen wurden, und durch wiederholtes Evakuieren unter Vakuum und Einleiten von Stickstoff (mindestens 4 Zyklen) an einer Vakuum-Gas-Anlage anoxisch gemacht wurden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Klonierung von *cooS-IV*

Das Gen, welches für CODH-IV_{Ch} codiert (*cooS-IV_{Ch}* CHY_RS03340), wurde durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung des *Phusion High Fidelity PCR Master Mix with HF* (New England Biolabs) amplifiziert (Tab. 2.11). Die zur Amplifikation benötigten Primer enthielten *NdeI* und *XhoI* Schnittstellen.

Tabelle 2.11: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *cooS-IV_{Ch}*.

Segment	Beschreibung	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
1	Initiale Denaturierung	98	30 s	1
2	Denaturierung	98	10 s	16
3	Anlagerung	57	60 s	
4	Elongation	72	60 s	
5	Finale Elongation	72	10 min	1

Das resultierende PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten und mit Hilfe des *GeneJET PCR Purification Kits* (Thermo Scientific) gereinigt. Als Zielvektor diente der Vektor pET28a (Novagen), welcher zuvor durch Insertion einer TEV-Schnittstelle modifiziert worden war (Dr. Martin Bommer, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin), und für eine N-terminale Polyhistidinmarkierung codiert. Der Zielvektor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* geschnitten. Die entstandenen Vektor-DNA-Fragmente wurden daraufhin mittels Agarose-Gelelektrophorese bei einer Spannung von 100 V ihrer Länge nach aufgetrennt. Mittels des *GeneJET Gel Extraction Kits* (Thermo Scientific) wurde die geschnittene Vektor-DNA aus dem Gel gereinigt. Das *cooS-IV_{Ch}* DNA-Fragment wurde dann mittels einer T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific) mit dem linearisierten Vektor nach Herstellerangaben ligiert. Die Ligation erfolgte im molaren Mengenverhältnis von 3_{Insert} : 1_{Vektor}. Der Ligationsansatz wurde für 1 h bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde das Ligationsprodukt in chemisch kompetente *E. coli* NEB5α Zellen transformiert. Zur Überprüfung der DNA-Sequenz wurden 4 ml Übernachtskulturen einiger Klone angelegt, deren Plasmid-DNA mittels des *NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits* (Macherey-Nagel) isoliert und sequenziert.

2.2.2.2 Mutagenese

Die gezielte Mutagenese einzelner Basenpaare des pPKS2-Plasmids wurde nach der *QuikChange* Methode durchgeführt (Agilent Technologies, La Jolla, CA, USA). Als DNA Polymerase diente die *DreamTaq DNA Polymerase* (Thermo Scientific). Der PCR-Ansatz (Tab. 2.12) wurde den in Tabelle 2.13 beschriebenen PCR-Zyklus Bedingungen unterzogen und danach zum Abbau der Vorlage-DNA 1 Stunde bei 37 °C mit *DpnI* inkubiert.

Tabelle 2.12: Exemplarische Darstellung eines *QuikChange* PCR-Ansatzes.

DANN	5 – 50 ng
Primer 1 (vorwärts)	125 ng
Primer 2 (rückwärts)	125 ng
dNTPs	0.2 mM
DreamTaq-Puffer (10x)	5 µl
DreamTaq DNA Polymerase	0.25 µl
Finales Volumen	50 µl

Nach Reinigung des Restriktionsansatzes mit Hilfe des *GeneJET PCR Purification Kits* (Thermo Scientific) wurden 5 µl DNA in *E. coli* NEB5α transformiert, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der mutierten DNA-Sequenz wurden 4 ml Übernachtskulturen einiger Klone angelegt und deren Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Tabelle 2.13: *QuikChange* PCR Bedingungen.

Segment	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
1	1	95	30 s
2	16	95	30 s
		55	60 s
		72	10 min

2.2.2.3 Agarose Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese bei einer Spannung von 100-120 V ihrer Länge nach aufgetrennt. TAE-Puffer (1x) wurde zur Herstellung 1%iger Agarosegele verwendet (Tab. 2.1). Zur Visualisierung der DNA-Fragmente wurde dem Gel *Roti-Gel Stain* (Roth) nach Herstellerangaben beigemischt.

2.2.2.4 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente Zellen verwendet (Inoue *et al.*, 1990). 150 µl Zellen wurden mit 1-5 µl DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte ein 45 Sekunden langer Hitzeschock bei 42 °C, woraufhin die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Nach Zugabe von 1 ml SOB-Medium wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt und danach ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.2.5 Sequenzierung

Zur Überprüfung von Plasmid-DNA wurde die Firma *Eurofins Genomics* (Ebersberg) mit der Sequenzierung ausgewählter DNA-Abschnitte beauftragt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe des *Clustal Omega* multiplen Sequenzvergleichs ausgewertet (Sievers *et al.*, 2011).

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Heterologe Genexpression von CODH-II und CODH-IV

Zu Beginn jeder heterologen Genexpression wurde das pPKS2- bzw. pPKS4-Plasmid in *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pRKISC transformiert. Es wurden mehrere 4 ml Übertagkulturen bei 37 °C für 8 h angezogen, von welchen die am besten gewachsene zur Inokulation der 100 ml Übernachtskultur gewählt wurde. Die Übernachtskultur wurde bei 30 °C geschüttelt. 1.8 l mTB-Medium (Tab. 2.7) wurden mit 0.5 mM NiCl₂, 0.1 mM Na₂S, 0.1 mM FeSO₄, 1 % Glucose und 500 µl Silicon-Antischaum-Emulsion (Wacker) versetzt, auf eine optische Dichte von circa 0.1 inokuliert und danach bei 30 °C mit Druckluft begast. Bei einer optischen Dichte von circa 0.5-0.6 wurde die Begasung auf Stickstoff umgestellt und die Proteinexpression mit 0.2 mM IPTG induziert. Die Ernte erfolgte 20-23 Stunden nach Induktion. Zellpellets wurden bis zur Aufreinigung bei -70 °C gelagert.

2.2.3.2 Proteinreinigung von CODH-II und CODH-IV

Sowohl CODH-II_{Ch} als auch CODH-IV_{Ch} wurden durch Nickelaffinitätschromatographie mittels N-terminalem *His-tag* gereinigt. Die Zusammensetzung der hier verwendeten Puffer kann Tabelle 2.2 entnommen werden. Zunächst wurde der Lysispuffer präpariert. 35 ml Lysispuffer wurden mit einer Spatelspitze DNaseI (AppliChem) und einer Spatelspitze Lysozym (Roth) versetzt. Dann wurden ca. 4 g Bakterienpellet im präparierten Lysispuffer

gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte durch eine 10-minütige Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonopuls, Mikrospitze, 50 % *duty cycle*, 50 % *power*), woraufhin die aufgeschlossenen Zellen 15 min gerührt wurden. Unlösliche Zellbestandteile wurden für 25 min bei 39191 x g (Beckmann Coulter, Avanti JE) abzentrifugiert.

Bevor der Überstand auf eine 1 ml Ni-Sepharose-Säule gegeben werden konnte, musste diese mit 10x Wasser, 5x Elutionspuffer (ohne DT), 10x Wasser und schließlich 10x Waschpuffer gewaschen werden. Nach dem Beladen der Ni-Sepharose-Säule wurde diese mit 5x Waschpuffer gewaschen und das Protein mit 5x Elutionspuffer eluiert. Um das Protein von Imidazol zu befreien, wurde es auf eine Sephadex G-25 Säule geladen und mit Lagerungspuffer eluiert. Das Protein wurde mittels einer Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon Ultra-4, Molekulargewichtsabscheidegrenze: 50 kDa) auf eine finale Konzentration von 20-50 mg/ml gebracht, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Reinigung der CODH-IV_{Ch} erfolgte analog zur Reinigung der CODH-II_{Ch}, erforderte aber einen zusätzlichen Zwischenschritt, da der N-terminale *His-tag* abgeschnitten wurde. Nach Elution des Proteins von der Ni-Sepharose Säule, wurde es auf eine Sephadex G-25 Säule geladen und mit TEV-Puffer eluiert. Das Eluat wurde mit TEV-Puffer auf 10 ml aufgefüllt, im molaren Verhältnis von 1:10 mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abtrennen der TEV-Protease wurde der Verdau über eine Ni-Sepharose Säule gegeben. Das eluierte Protein wurde in einer Zentrifugen-Filtereinheit (Amicon Ultra-4, Molekulargewichtsabscheidegrenze: 50 kDa) dreimal mit Lagerungspuffer gewaschen, konzentriert (20-50 mg/ml), aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Die Proben wurden mit SDS-Ladepuffer gemischt und in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde zunächst eine Spannung von 80 V (Sammelgel) und später 120 V (Trenngel) angelegt. Als Größenstandard diente *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (10 - 170 kDa) der Firma *Thermo Scientific*. Die Zusammensetzung der benötigten Lösungen und Puffer zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und zur Herstellung von SDS-Gelen kann Tabelle 2.3 und 2.4 entnommen werden.

2.2.3.4 Proteinfärbung mit Coomassie

Durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennte Proteine konnten mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie (Brilliant) Blue R 250 sichtbar gemacht werden (Tab. 2.5). Dafür wurde das Polyacrylamid-Gel über Nacht in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und danach mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

2.2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Gesamtproteingehalt einzelner Proben wurde nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Dafür wurde der *Quick Start Bradford Protein Assay* (Bio-Rad) verwendet. Je 20 µl Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Für die Berechnung der Proteinkonzentration im Ansatz wurde eine Verdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt und die Eichgerade ermittelt.

2.2.3.6 Messung der enzymatischen Aktivität

Standardmäßig wurde zur Bestimmung der spezifischen CO-Oxidationsaktivität der CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} die CO-abhängige Reduktion von oxidiertem Methylviologen (MV_{ox}, $\epsilon_{578} = 9.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) verfolgt (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Nach jeder Reinigung wurde die jeweilige CO-Oxidationsaktivität bei 25 °C überprüft. Um das Enzym zu aktivieren, wurde es zunächst in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 2 mM DT, 2 mM DTT verdünnt und mindestens eine Stunde inkubiert. Dann wurde eine verschließbare Küvette mit CO gespült und mit CO-gesättigtem Methylviologensuspuffer (Puffer MH, siehe Tab. 2.6) befüllt. Die Injektion des Enzyms startete die Reaktion. Die spezifische Aktivität konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für Methylviologen ermittelt werden, dabei wurde eine Aktivitätseinheit als 1 µmol CO-Verbrauch pro Minute ($U = \mu\text{mol min}^{-1}$) definiert. CODH-IV_{Ch} wurde zusätzlich auf die Fähigkeit überprüft NAD⁺ bzw. NADP⁺ als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden (NAD⁺- / NADP⁺-Puffer). Hierfür wurde die Absorptionsänderung bei 340 nm verfolgt.

Zur Bestimmung der Temperatur- bzw. pH-Abhängigkeit der CO-Oxidationsaktivität von CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} wurde analog verfahren. Die Aktivität der Enzyme wurde bei definierten Temperaturen in einem Bereich von 25 °C – 59 °C unter Verwendung von Puffer MP bestimmt. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurde eine Arrhenius-Darstellung gewählt, in welcher der natürliche Logarithmus der Umsatzrate k_{cat} gegen den Kehrwert der Temperatur in Kelvin aufgetragen wurde. Für die Bestimmung der pH-Abhängigkeit der

Enzyme wurden Puffer mit einem pH-Wert in einem Bereich von 5.5 bis 9.0 verwendet (Tab. 2.6).

Zur Ermittlung des Einflusses von O₂ auf die CO-Oxidationsaktivität der CODH-II_{Ch} wurden 10 µl CODH-II Proben (50 µM in Puffer MR) mit O₂ behandelt und ähnlich des in Kapitel 2.2.4.1 beschriebenen Kristallisationsansatzes für 24 h bei 18 °C inkubiert. Bei definierten Zeitpunkten (0 min, 1 min, 15 min, 35 min, 90 min, 4 h, 24 h) wurden Proben genommen, deren spezifische CO-Oxidationsaktivität nach Reaktivierung durch eine DT/DTT-Mischung (Puffer MA) gemessen wurde.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der CODH-II_{Ch} Enzymvarianten wurde mit CO bzw. N₂ gesättigter Methylviologenpuffer (Puffer MH) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und die spezifische Aktivität wie bereits beschrieben bestimmt. Die tatsächliche CO-Konzentration des gemischten Puffers wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes über die finale Absorption des Methylviologens ermittelt, dabei war zu beachten, dass 2 µmol CO 1 µmol Methylviologen reduzieren. Mit Hilfe des Programms *GraFit* (Leatherbarrow, 2009) wurden Sättigungskurven der Enzymreaktionen erstellt. Aus diesen ließen sich die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) und der K_m -Wert ableiten.

2.2.4 Röntgenkristallographische Methoden

2.2.4.1 Kristallisation der CODH-II und CODH-IV

Sämtliche Kristallisationsexperimente wurden bei einer Temperatur von 18 °C durchgeführt. Die Kristallisationsbedingungen der CODH-II_{Ch} waren zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt (Fessler *et al.*, 2015). CODH-II_{Ch} wurde nach dem *hanging drop* Verfahren kristallisiert. Es wurden 3 µl Proteinlösung (12 mg/ml) mit 3 µl Reservoirlösung (0.1 M Bis-Tris (pH 6.5), 0.05-0.2 M Ammoniumsulfat, 10 -15 % PEG3350, 2 mM DT) gemischt. Mittels *streak-seeding* entstanden nach ca. einer Woche Kristalle, welche danach innerhalb von 3 Wochen bis zu ihrer finalen Größe anwuchsen.

Die Kristallisation der CODH-IV_{Ch} erfolgte nach dem *sitting drop* Prinzip unter Verwendung der kommerziell erhältlichen Kristallisationsscreens *MIDAS* (*Molecular Dimensions*), *PACT Premier* (*Molecular Dimensions*), *PEG/ION* (*Hampton Research*), *Proplex* (*Molecular Dimensions*), *SaltRx* (*Hampton Research*) und *Wizard I+II* (*Rigaku*). 0.75 µl Proteinlösung (16 mg/ml) wurden mit 0.75 µl Reservoirlösung gemischt. Reproduktionsversuche einzelner Bedingungen wurden nach dem *hanging drop* bzw. *sitting*

drop Verfahren durchgeführt. Dabei wurden 2 μ l Proteinlösung (13 mg/ml) mit 2 μ l Reservoirlösung gemischt.

2.2.4.2 Manipulation von Kristallen

Zur Herstellung verschiedener Zustände der CODH-II_{Ch} wurden die in Tabelle 2.14 beschriebenen Puffer verwendet. Reduktionsmittel wurden vor der Kristallbehandlung frisch hergestellt. 1 M DT und 1 M DTT wurden in 1 M Tris-HCl (pH 8.0) gelöst. Eine 83 mM Ti³⁺-Citrat-Lösung wurde durch das Mischen von 77 μ l Titan(III)-chlorid (20 % (w/v) in 2 N HCl, Acros Organics) und 500 μ l 0.5 M Natriumcitrat-Lösung hergestellt und durch das Zufügen von 625 μ l 1 M Tris (pH 8.0) abgepuffert (Seefeldt und Ensign, 1994).

Um eine einheitliche Ausrichtung der Zustände im Kristall zu erreichen, wurden die Kristalle zunächst in Puffer A für eine Stunde inkubiert. Zur Herstellung des -320 mV Zustands wurden sie daraufhin dreimal in Puffer B gewaschen und zu einer weiteren einstündigen Inkubation in Puffer C transferiert. Der CN⁻-gebundene Zustand konnte durch eine 30-minütige Behandlung mit Puffer C-1 erstellt werden. Kristalle im -320 mV + CN⁻ wurden zur Behandlung mit O₂ zunächst in CN⁻-freien Puffer transferiert und daraufhin mit Puffer O behandelt. Puffer D enthielt das Oxidationsmittel Thionin und erlaubte so die Analyse oxidationsinduzierter Veränderungen der CODH-II_{Ch}.

Zur Untersuchung der Auswirkung von O₂ auf die CODH-II_{Ch} wurden Kristalle zunächst eine Stunde in Puffer A inkubiert. Daraufhin wurden sie außerhalb des anoxischen Handschuhkastens mit Puffer O behandelt. Im Verlauf von 24 Stunden wurden die Kristalle mehrfach mit O₂ behandelt und zeitabhängig in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Als Kryomittel wurde den verschiedenen Puffern jeweils 15 % (v/v) 2,3-Butandiol beigemischt. CODH-IV_{Ch}-Kristalle wurden ohne Verwendung eines Kryomittels schockgefroren.

Tabelle 2. 14: Verwendete Puffer zur Behandlung von CODH-II Kristallen.

Bezeichnung	Zustand	Zusammensetzung
Puffer A	- 600 mV	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % PEG 3350, 5 mM Ti^{3+} -Citrat-Lösung
Puffer B	- 320 mV + MV	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % PEG 3350, 7 mM DTT, 0.3 mM MV_{ox}
Puffer C	- 320 mV	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % PEG 3350, 7 mM DTT
Puffer C-1	- 320 mV + CN	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % PEG 3350, 7 mM DTT, 4.5 mM KCN
Puffer D	Oxidiert	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % PEG 3350, 0.5 mM Thioninacetat
Puffer O	-	50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 % PEG 3350, O_2 -gesättigt

2.2.4.3 Datensammlung

Diffraaktionsdaten wurden am Elektronenspeicherring BESSY II (Berlin, Deutschland) an den Beamlines 14.1 und 14.2 (Mueller *et al.*, 2012) sowie am DESY (Hamburg, Deutschland) an der Beamline P11 (Meents *et al.*, 2013; Burkhardt *et al.*, 2016) aufgenommen. Während der Messung befanden sich die Kristalle in einem konstanten Stickstoffstrom bei 100 K. Standarddatensammlungen wurden bei einer Wellenlänge von 0.91841 Å vorgenommen, wohingegen zur Identifikation von Nickel, Eisen und Schwefel eine Änderung der Wellenlänge erforderlich war. Um die optimale Wellenlänge für Ni (Ni-K-Kante: 1.4879 Å) und Fe (Fe-K-Kante: 1.7433 Å) zu ermitteln, wurde jeweils ein *edge scan* durchgeführt, die Lage der jeweiligen K-Kante überprüft und die Wellenlänge entsprechend angepasst. Die jeweiligen Absorptionskanten sind dem Anhang zu entnehmen. Die S-K-Kante bei 5.0155 Å war mit der vorliegenden experimentellen Apparatur nicht zu erreichen, deswegen wurde bei einer Wellenlänge von 1.883 Å gemessen, bei welcher ein schwaches S-Signal aufgenommen werden kann. So zeigten die S-Atome des C-Clusters im -600 mV-Zustand ein S-Signal von 0.056 e/Å³. Im Vergleich dazu ist das Fe-Signal mit 0.39 e/Å³ ca. 7-mal höher. Zur initialen Indizierung und Ermittlung der optimalen Datensammelungsstrategie wurde iMosflm (Battye *et al.*, 2011) verwendet. Mit Hilfe von

XDSAPP (Sparta *et al.*, 2016) wurden die gesammelten Diffraktionsbilder indiziert, integriert und analysiert.

2.2.4.4 Strukturbestimmung, Strukturverfeinerung und Evaluation

Zur weiteren Bearbeitung der Daten wurden die Programmpakete *Phenix* (Adams *et al.*, 2010) und *CCP4* (Winn *et al.*, 2011) verwendet. Sowohl die verschiedenen Strukturen der CODH-II_{Ch} als auch die Struktur der CODH-IV_{Ch} wurden mit Hilfe des Programmes *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007), welches ein automatisiertes *Molecular Replacement* durchführt, gelöst. Als Suchmodell diente hierbei die bereits bekannte Struktur der CODH-II_{Ch} im -600 mV-Zustand (pdb-ID: 3B51). Abwechselnde Zyklen von Strukturverfeinerung und Modellbau mittels *Refmac5* (Vagin *et al.*, 2004) bzw. *Phenix.Refine* (Adams *et al.*, 2010) und *Coot* (Emsley *et al.*, 2010) erlaubten eine Verfeinerung der gelösten Strukturen. Für den C-Cluster der CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} mussten jeweils unter Zuhilfenahme von *Refmac5 restraints* erstellt werden, welche im Verlauf der Verfeinerung weiter angepasst wurden. Die resultierenden Modelle wurden mit Hilfe des Programmes *PyMOL* (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Version 1.8.x) bearbeitet und dargestellt. Analysen der Oberflächenladung von Proteinen wurden mit Hilfe des *PyMol Plugins APBS* (Baker *et al.*, 2001) durchgeführt. Die Untersuchung solvenszugänglicher Oberflächen von Proteinen ermöglichte das Programm *areaimol* aus dem Programmpaket *CCP4*.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASE II

3.1.1 Heterologe Expression und Reinigung

Ein Expressionssystem für CODH-II_{Ch} war zu Beginn der Arbeit bereits vorhanden und konnte im Verlauf dieser weiter verfeinert und vereinfacht werden. Der Maßstab der Kultivierung wurde von 0.8 l auf 1.6 l pro Flasche erhöht. Additive wurden nur zu Beginn der Kultivierung hinzugegeben, von Additivzugabe (ausgenommen IPTG) während der Kultivierung wurde abgesehen. Außerdem wurde die Zusammensetzung der Additive angepasst. Es wurden 1 % Glukose zum ursprünglichen Additivgemisch hinzugefügt. Die Expression der CODH-II_{Ch} konnte durch Probennahme vor Induktion der Proteinexpression (t = 0 h) und vor der Ernte der Zellen (t = 20-23 h) nachverfolgt werden. Die Proben wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch den Expressionsverlauf der CODH-II_{Ch}. Nach Induktion ist eine Bande bei ca. 65 kDa, welche mit dem errechneten Molekulargewicht der CODH-II_{Ch} (66.9 kDa) übereinstimmt, zu erkennen.

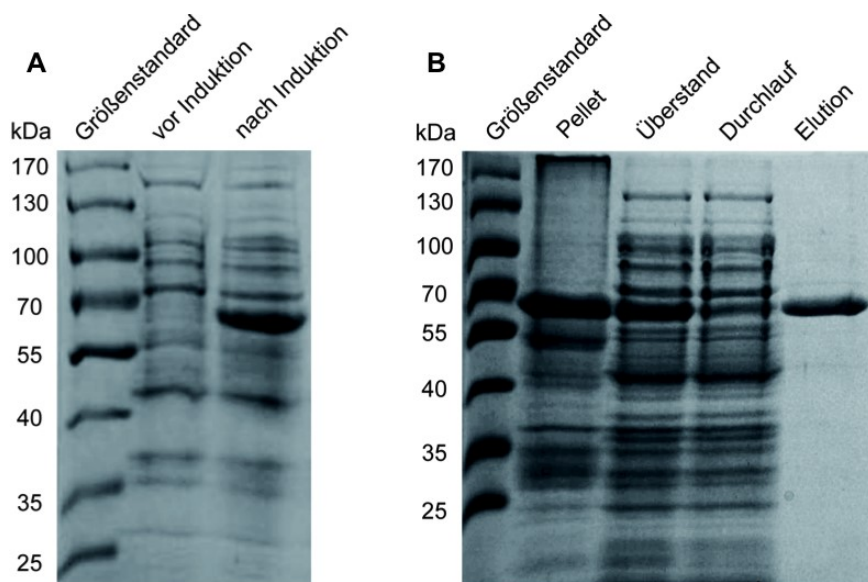


Abbildung 3.1: Heterologe Expression (A) und Reinigung (B) der CODH-II_{Ch}. Es wurden 12%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet und jeweils 5 µl Größenstandard aufgetragen. (A) Proteinexpression vor (t = 0 h) und nach Induktion (t = 22 h). (B) Verlauf der Reinigung von CODH-II_{Ch}. Es wurden Proben von Pellet, Überstand, Durchlauf und Elution aufgetragen.

Pro 1 Zellkultur konnten im Durchschnitt 2 g Nasszellgewicht erreicht werden. Im Anschluss wurde CODH-II_{Ch} mittels N-terminalem *His-tag* über eine Nickel-Sepharose-Säule gereinigt und anschließend entsalzt. In Abb. 3.1 ist zu erkennen, dass ein Großteil der CODH-II_{Ch} im Pellet verbleibt. Die native CODH-II liegt in *C. hydrogenoformans* membranassoziiert vor (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Die heterolog in *E. coli* exprimierte CODH-II_{Ch} könnte ähnlich lokalisiert sein und sich daher im Pellet anreichern. Im Durchschnitt konnten pro g Nasszellgewicht 6 mg Protein gewonnen werden.

3.1.2 Kristallisation

Zu Beginn dieser Arbeit waren die Kristallisationsbedingungen für CODH-II_{Ch} bereits bekannt (Fessler, 2015). CODH-II_{Ch} wurde mittels des Dampfdiffusionsverfahrens unter anoxischen Bedingungen bei 18 °C kristallisiert. Aufgrund der geringen Präzipitantkonzentration musste die Nukleation durch *streak-seeding* herbeigeführt werden. Unter den gewählten Bedingungen konnte nach einer Woche die Entstehung von Kristallen, welche innerhalb von drei weiteren Wochen bis zu ihrer finalen Größe anwuchsen, beobachtet werden.

3.1.3 Enzymvarianten der CODH-II_{Ch}

Es wurde ein Sequenzvergleich von CODHs aus *C. hydrogenoformans*, *M. thermoacetica* und *R. rubrum* durchgeführt, um konservierte Proteinreste zu identifizieren. In Abbildung 3.2 ist dieser Sequenzvergleich dargestellt. Die Konservierung eines Proteinrests kann auf eine essentielle Funktion des Rests für das Protein hindeuten. So sind z.B. sämtliche Proteinreste, die die Metallcluster der CODHs koordinieren konserviert. In dieser Arbeit wurden einige der konservierten Proteinreste für eine strukturelle und kinetische Charakterisierung in CODH-II_{Ch} ausgewählt. Sie sind in Abbildung 3.2 rot markiert.

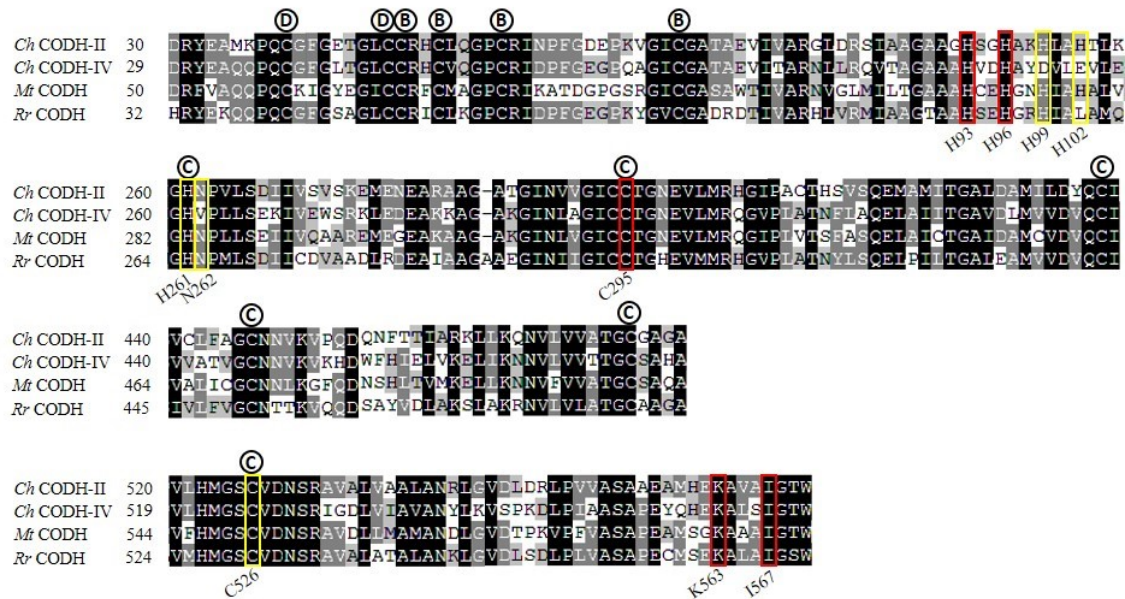


Abbildung 3.2: Sequenzvergleich der CODH-II_{Ch}, CODH-IV_{Ch}, CODH_{Mt} und CODH_{Rr}. Die Proteinreste sind anhand ihres Konservierungsgrads schattiert, wobei konservierte Reste schwarz unterlegt sind. Proteinreste, die nicht in allen untersuchten CODH-Sequenzen konserviert sind, wurden grau gekennzeichnet. Ausgehend von der Struktur der CODH-II_{Ch} wurden koordinierende Reste des B-Clusters (B), C-Clusters (C) und D-Clusters (D) durch Symbole gekennzeichnet. Reste, die in dieser Arbeit untersucht wurden sind rot gekennzeichnet. Weitere relevante Reste sind gelb markiert.

3.1.3.1 Wildtyp C-Cluster

Als Ausgangszustand der Untersuchungen diente der *as isolated* Zustand des CODH-II_{Ch} Wildtyps. Der C-Cluster des CODH-II_{Ch} Wildtyps ist ein [NiFe₄S₄OH_x]-Cluster, welcher aus einem verzerrt kubanen [NiFe₃S₄]-Kern und einem *exo*-Fe besteht. Das *exo*-Fe nimmt zwei Positionen ein (A: 45 %, B: 40 %) und bindet in Position A einen OH_x-Liganden. Es wird durch die Protein-Reste H261 und C295 koordiniert. Die Funktion des C295 soll durch einen Austausch des desselbigen in dieser Arbeit näher beleuchtet werden. Die Fe-Atome des [NiFe₃S₄]-Kerns werden von den Cystein-Resten C295, C333, C446 und C476 koordiniert. Der Cystein-Rest C526 koordiniert das Ni-Atom, wobei C526 abhängig von der Besetzung der Nickels zwei Konformationen ausbildet. Das Nickelatom weist im CODH-II_{Ch} Wildtyp eine Besetzung von 56 % auf, wohingegen die übrigen Metallatome zu ca. 80 % besetzt sind. In der zweiten Koordinationssphäre des Clusters liegen die Proteinreste H93, K563 und I567, die ebenfalls in dieser Arbeit näher betrachtet werden sollen. In Abbildung 3.3 sind der C-Cluster der CODH-II_{Ch} und relevante Seitenketten der 1. und 2. Koordinationssphäre dargestellt.

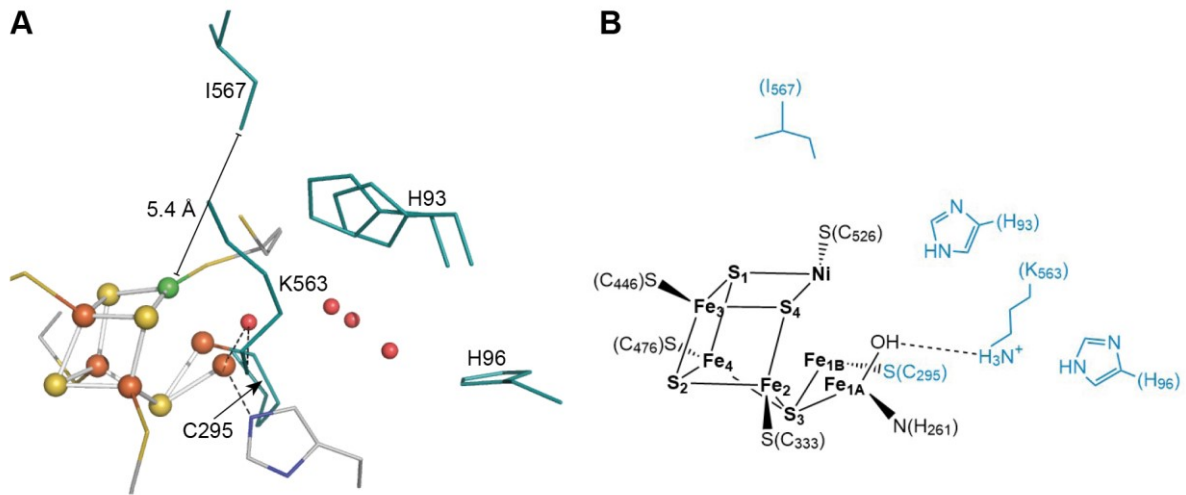


Abbildung 3.3: Darstellung des C-Clusters der CODH-II_{Ch} im *as isolated* Zustand als Kugel-Stab-Modell (A) und als schematische Zeichnung (B). Die in dieser Arbeit untersuchten Seitenketten wurden blau markiert.

Die CODH-II_{Ch} katalysiert die Oxidation von CO zu CO₂ und die entsprechende Rückreaktion. Wird die Aktivität der hier untersuchten rekombinanten CODH-II_{Ch} anhand des Ni-Besetzungsgrads normiert, zeigt die CODH-II_{Ch} mit Methylviologen als Elektronenakzeptor eine CO-Umsatzrate von 1822 s⁻¹ bei 25 °C. Bei 70 °C liegt die rechnerisch ermittelte Aktivität der rekombinanten CODH-II_{Ch} bei 17130 s⁻¹ (Aktivierungsfaktor = 9.4, Dr. Jae-Hun Jeoung, Humboldt-Universität zu Berlin, persönliche Kommunikation). Damit ist die rekombinante CODH-II_{Ch} trotzdem nur ca. halb so aktiv wie die native CODH-II_{Ch} (31000 s⁻¹ bei 70 °C) (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Grund hierfür könnte eine abweichende Behandlung des Enzyms sein, wie z.B. Verdünnungsfehler oder ein abweichendes Protokoll zur Aktivierung des Enzyms. Bei 25 °C wurde für die Wildtyp CODH-II_{Ch} ein K_m von 8.7 µM bestimmt (Abb. 3.4). Wiederum diente hier Methylviologen als Elektronennakzeptor. Der ermittelte K_m stimmt mit dem K_m der nativen CODH-II_{Ch} (18 µM) (Svetlitchnyi *et al.*, 2001) und dem elektrochemisch bestimmten K_m der rekombinanten CODH-II_{Ch} (8 µM) (Domnik *et al.*, 2017) überein. Die katalytische Effizienz (k_{eff}) definiert sich nach Gleichung 6 aus dem Quotienten der CO-Umsatzrate k_{cat} und dem K_m -Wert für CO.

$$k_{eff} = \frac{k_{cat}}{K_m} \quad (6)$$

Für die hier untersuchte rekombinante CODH-II_{Ch} konnte bei 25 °C eine katalytische Effizienz von $2.09 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ermittelt werden.

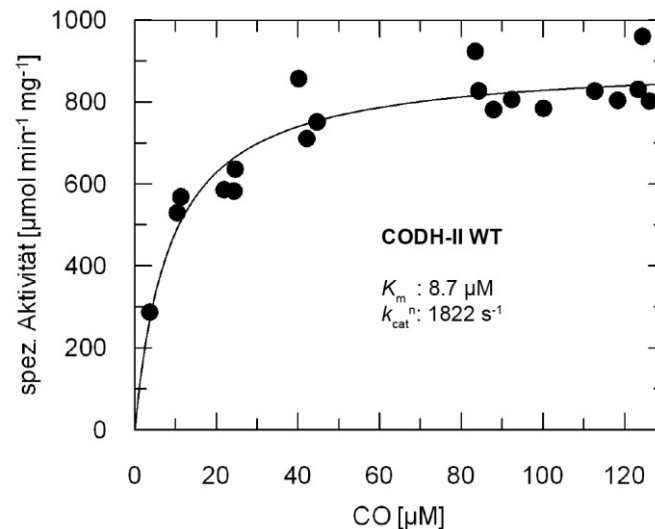


Abbildung 3.4: Bestimmung der CO-Oxidationsaktivität des CODH-II_{Ch} Wildtyps bei 25 °C. Die spezifische Aktivität für verschiedene CO-Konzentrationen wurde indirekt durch die Oxidation von MV spektralphotometrisch verfolgt. Die jeweiligen CO-Konzentrationen im Versuchsansatz wurden über die finale Absorption des MV ermittelt. Die Daten wurden einer nicht-linearen Regression mit der Michaelis-Menten-Gleichung unterzogen. Die ermittelte Umsatzrate k_{cat} (s. Tab. 3.1) wurde anhand der Ni-Besetzung normalisiert.

3.1.3.2 Das Protonentransfernetzwerk der CODH-II_{Ch}

Bei der Oxidation von CO am C-Cluster der CODH-II entstehen als Produkte CO₂, zwei Elektronen und zwei Protonen. CO₂ kann über die Gaskanäle des Proteins den C-Cluster verlassen (Dobbek *et al.*, 2001; Fessler, 2015; Wang *et al.*, 2013a; Fessler, 2015). Elektronen werden vermutlich über den B-Cluster zum D-Cluster an die Proteinoberfläche weitergeleitet (Jeoung und Dobbek, 2007). Es wurde für die CODH_{Rr} die Existenz eines Protonentransfernetzwerks vorgeschlagen, welches in der CODH/ACS_{Mt} nachgewiesen werden konnte. Die hier beteiligten Aminosäurereste könnten als Basen fungieren und sind innerhalb der CODHs konserviert (Abb. 3.2). In Abbildung 3.5 ist das postulierte Protonentransfernetzwerk der CODH/ACS_{Mt} im Vergleich mit den konservierten Resten der CODH-II_{Ch} dargestellt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Reste wurden blau markiert.

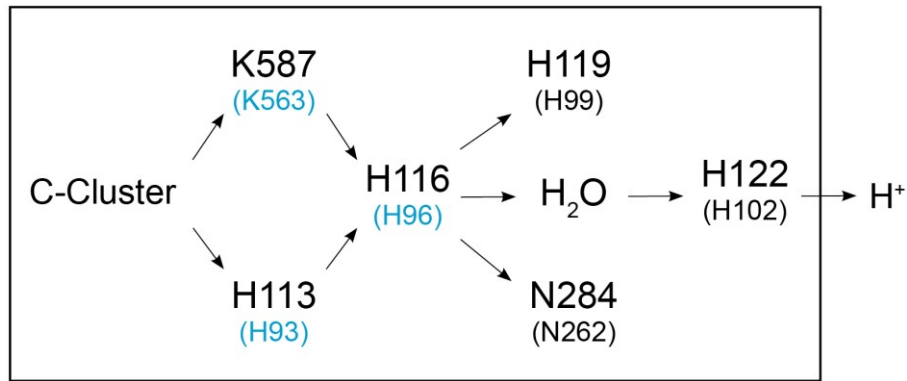


Abbildung 3.5: Protonentransfernetzwerk in der CODH/ACS_{Mt} und CODH-II_{Ch} (in Klammern). In dieser Arbeit untersuchte Reste wurden blau markiert. Verändert nach (Kim *et al.*, 2004).

Die bisherige Untersuchung des Protonentransfernetzwerks der CODH/ACS_{Mt} beschränkte sich auf die Charakterisierung von Enzymvarianten bezüglich ihrer spezifischen Aktivität. In dieser Arbeit wurden daher die Reste H93, K563 und H96 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dabei wurden neben der Umsatzrate auch die Struktur und soweit möglich die K_m -Werte der Enzymvarianten bestimmt. So konnte zum einen beurteilt werden, ob Veränderungen der Umsatzrate durch strukturelle Veränderungen des C-Clusters bedingt sind, zum anderen konnte die Aktivität anhand des Ni-Besetzungsgrad normiert werden, was einen direkten Vergleich der CO-Oxidationsaktivitäten der Enzymvarianten und des Wildtyps erlaubte.

Die Untersuchung der K563A-Variante zeigte eine veränderte Position des OH_x-Liganden. In der *as isolated* Struktur der CODH-II_{Ch} bindet das Fe₁ einen OH_x-Liganden, welcher durch den Proteinrest K563 stabilisiert wird. In der K563A-Variante kann K563 diese stabilisierende Funktion nicht mehr übernehmen. Anstelle des OH_x-Liganden liegt hier nun ein Wassermolekül vor, welcher sich jeweils in einem Abstand von 2.7 Å zum Fe₁ bzw. Ni befindet und somit wahrscheinlich nicht von diesen koordiniert wird. Auch der Besetzungsgrad des Nickels wird durch den Austausch des Lysin-Rests beeinflusst. Im *as isolated* Zustand der CODH-II beträgt dieser 56 %. In der K563A-Variante verringert sich dieser etwa um die Hälfte auf 28 %. Unter Berücksichtigung des verringerten Nickelgehalts wurde für die K563A-Variante eine normierte Umsatzrate von 66 s⁻¹ bestimmt (Tab. 3.1). Im Vergleich mit der WT CODH-II_{Ch}, welche eine normierte Umsatzrate von 1822 s⁻¹ hat, zeigt die K563A-Variante also nur 4 % WT-Aktivität. Für die K563A-Variante wurde ein K_m von 20.9 µM bestimmt. Dieser unterscheidet sich geringfügig von dem des Wildtyps, welcher bei 8.7 µM liegt (Abb. 3.6).

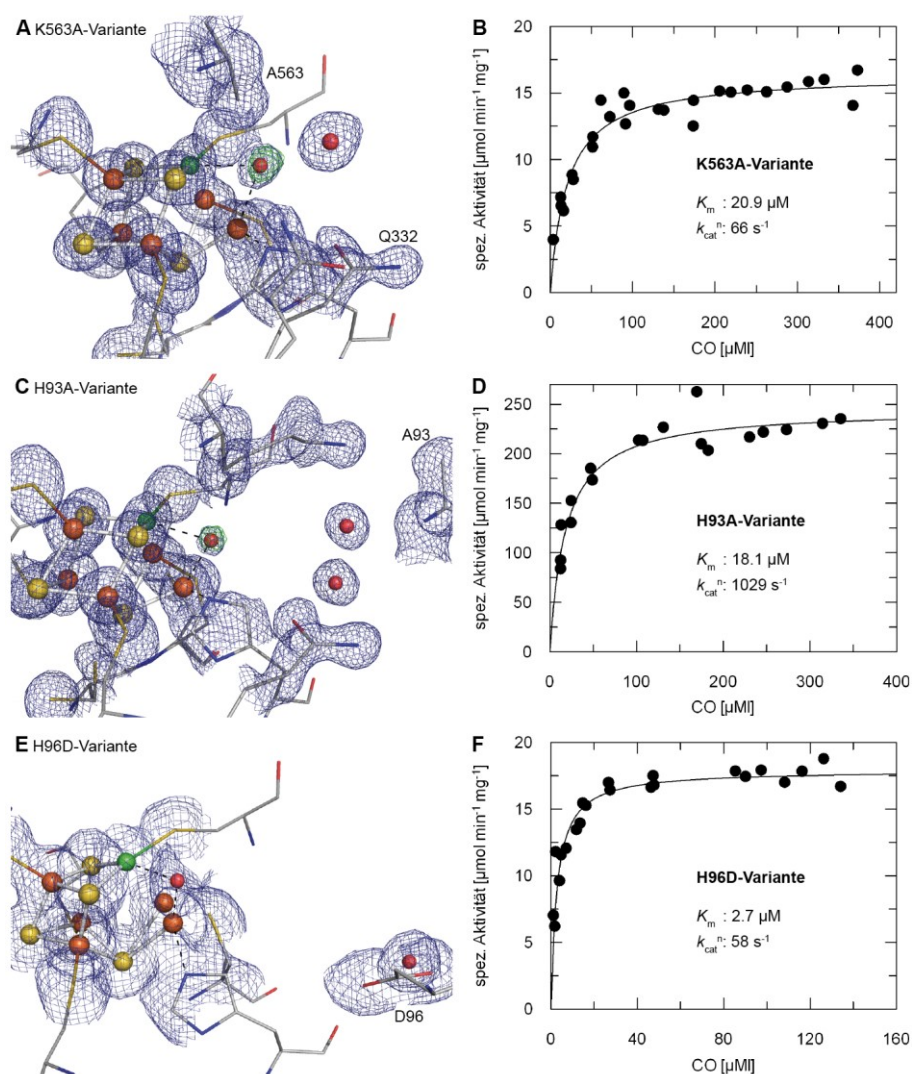


Abbildung 3.6: Strukturelle und kinetische Charakterisierung der Enzymvarianten des Protonentransfernetzwerks der CODH-II_{Ch}. Ni-Atome sind grün, Fe-Atome orange, S-Atome gelb und O-Atome rot dargestellt. 2F_o-F_c Elektronendichtekarten (blau) wurden bei 1.0 σ und F_o-F_c Elektronendichtekarten wurden bei 3.0 σ konturiert. CO-Oxidationsaktivitäten wurden bei 25 °C bestimmt. Die spezifische Aktivität für verschiedene CO-Konzentrationen wurde indirekt durch die Oxidation von MV spektralphotometrisch verfolgt. Die jeweiligen CO-Konzentrationen im Versuchsansatz wurden über die finale Absorption des MV ermittelt. Die Daten wurden einer nicht-linearen Regression mit der Michaelis-Menten-Gleichung unterzogen. Die ermittelte Umsatzrate k_{cat} (s. Tab. 3.1) wurde anhand der jeweiligen Ni-Besetzung normalisiert. (A) C-Cluster der K563A-Variante. (B) Michaelis-Menten Kinetik der K563A-Variante. (C) C-Cluster der H93A-Variante. (D) Michaelis-Menten Kinetik der H93A-Variante. (E) C-Cluster der H96D-Variante. (F) Michaelis-Menten Kinetik der H96D-Variante.

Auch durch den Austausch des H93 durch Alanin verändert sich die Position des OH_x-Liganden. So nimmt K563 den durch den Austausch frei gewordenen Raum ein, wodurch auch das in der Nähe befindliche Q332 destabilisiert wird. Beide Aminosäurereste lassen sich nicht mehr eindeutig modellieren. Der OH_x-Ligand nimmt nun einen Platz in 2.24 Å Entfernung zum Fe₁ ein. Vermutlich ändert der OH_x-Ligand seine Position nicht stärker, da

er zumindest teilweise noch von einer hier nicht mehr modellierbaren alternativen Konformation des K563 stabilisiert wird. Der Nickelbesetzungsgrad ist auch in dieser Enzymvariante um etwa die Hälfte verringert und liegt bei 27 %. Interessanterweise weist die H93A-Variante eine CO-Umsatzrate von 1029 s⁻¹ auf, was 56 % der WT-Aktivität entspricht. Der hier ermittelte K_m -Wert von 18.1 μ M unterscheidet sich geringfügig von dem des Wildtyps.

Tabelle 3.1: Kinetische Parameter des Wildtyps und der Enzymvarianten der CODH-II_{Ch}.

Enzymvariante	Ni-Besetzung	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}^n [s ⁻¹]*	K_m [μ M]	k_{cat}^n / K_m [s ⁻¹ M ⁻¹]	$\Delta\Delta G_{ES\ddot{S}}$ [kJ mol ⁻¹]
-	0.56	1021	1822	8.7 \pm 1.5	2.09 \cdot 10 ⁸	-
K563A	0.28	19	66	20.9 \pm 2.5	3.17 \cdot 10 ⁶	11.95
H93A	0.27	278	1029	18.1 \pm 2.5	5.69 \cdot 10 ⁷	3.72
H93E	0.10	43	431	-	-	-
H93AK563A	0.15	12	79	-	-	-
H96D	0.35	20	58	2.7 \pm 0.3	2.15 \cdot 10 ⁷	6.50

* k_{cat} normalisiert anhand des Ni-Besetzungsgrads.

Der Austausch des H93 durch Glutamat verursacht eine Umlagerung des K563 in die Nähe des E93. Der OH_x-Ligand kann in der Struktur nicht mehr identifiziert werden und das Fe₁ besetzt in einem höheren Maß seine alternative B-Position (Fe_{1A}: 25 %, Fe_{1B}: 65 %). Der Besetzungsgrad des Nickels verringert sich auf 10%, wobei nicht klar ist ob, Fe₁ das Ni aus seiner angestammten Position verdrängt oder die Fe_{1B}-Position durch eine geringere Ausprägung des Ni begünstigt wird. Der Austausch des H93 durch Glutamat bewirkt im Vergleich zur H93A-Variante eine stärkere strukturelle Veränderung, welche sich auch in einer geringeren CO-Umsatzrate von 431 s⁻¹ (entspricht 23 % WT-Aktivität) widerspiegelt. Auch in der K563AH93A-Variante kann der OH_x-Ligand nicht mehr identifiziert werden. Der Austausch der beiden Seitenketten führt zu einer Destabilisierung umliegender Seitenketten wie z.B. des Q332, welches eine alternative Konformation annimmt. Anomale Diffraktionsexperimente zeigten, dass Fe₁ nun vollständig die B-Position besetzt (Anhang, Abb. A.1). Auch hier kann eine Verringerung der Ni-Besetzungsgrads (15 %) beobachtet werden. Wie schon zuvor für die H93E-Variante beschrieben bleibt die Ursache dieser strukturellen Veränderung unklar. Anstelle des Fe_{1A} kann ein Wassermolekül identifiziert werden. Trotz dieser gravierenden strukturellen Veränderungen konnte eine CO-Umsatzrate von 79 s⁻¹ bestimmt werden, was 4 % WT-Aktivität entspricht.

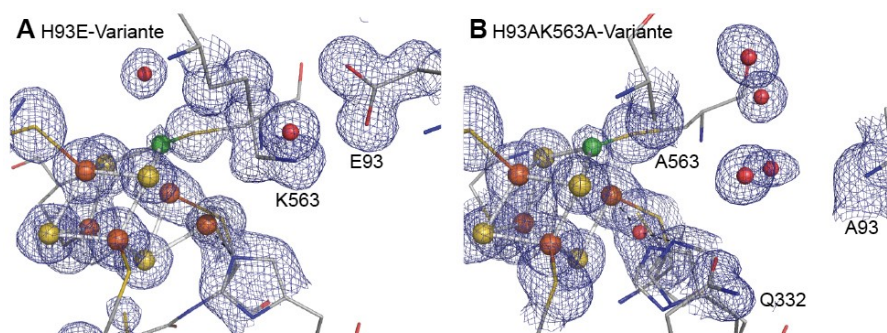


Abbildung 3.7: C-Cluster der H93E-Variante (A) und H93AK563A-Variante (B) der CODH-II_{Ch}. Ni-Atome sind grün, Fe-Atome orange, S-Atome gelb und O-Atome rot dargestellt. Die 2F_o-F_c Elektronendichtekarten (blau) wurden bei 1.0 σ konturiert.

H93 und K563 übernehmen vermutlich mehrere Funktionen bei der Oxidation des CO. So zeigten Untersuchungen von CODH-II_{Ch} Kristallen, welche mit NaHCO₃-Lösung inkubiert wurden, einen Ni-gebundenen Carboxylatkomplex, welcher durch die Seitenketten H93 und K563 stabilisiert wird (Jeoung und Dobbek, 2007, 2009; Fessler *et al.*, 2015). Die Verringerung der Aktivität und leichte Erhöhung der K_m -Werte der H93- und K563-Varianten spricht für die Beteiligung der Seitenketten im katalytischen Prozess. In CODH_{Mt} sind die Seitenketten H113 und H116 (H93 und H96 in CODH-II_{Ch}) vermutlich an einem dynamischen CO₂-Transportweg beteiligt, über welchen der Abtransport des CO₂ nach der CO-Oxidation sichergestellt werden kann (Wang *et al.*, 2013a). Auch in CODH-II_{Ch} ist eine ähnliche Rolle von H93 und H96 denkbar. Eine weitere Rolle der Seitenketten wurde im Protonentransfer ausgemacht. In der bereits erwähnten Studie der CODH/ACS_{Mt} konnten H113 und K587 (entspricht H93 und K563 in CODH-II_{Ch}) als Teil eines Protonentransfernetzwerkes identifiziert werden. Dabei wurde den einzelnen Seitenketten eine gleichwertige Bedeutung zugeschrieben, da ihr Austausch eine ähnliche Verringerung der Aktivität hervorrief. Der Austausch beider Seitenketten führte zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität (Kim *et al.*, 2004). In CODH-II_{Ch} kann die erste Beobachtung nicht bestätigt werden. Der Austausch des K563 zeigt einen weitaus stärkeren Effekt als der des H93. So hat die H93A-Variante noch 56 % WT Aktivität, wohingegen die K563A-Variante nur noch 4 % WT-Aktivität aufweist und auch die katalytische Effizienz der K563A-Variante ist stärker verringert als die der H93A-Variante. Der vollständige Verlust der Aktivität der H93AK563A-Variante kann jedoch bestätigt werden. Die Verringerung der Aktivität wird hier vor allem durch eine strukturelle Reorganisation des Clusters begründet (Abb. 3.7). H93 und K563 könnten demnach eine weitere Funktion haben, nämlich die Stabilisierung des C-Clusters.

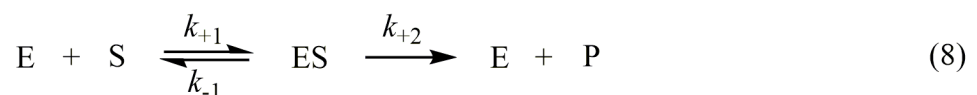
Auch die Position des OH_x-Liganden wird von H93 und K563 beeinflusst. In keiner der beschriebenen Enzymvarianten ähnelt die Position des Liganden der im Wildtyp, in der H93E-Variante ist der OH_x-Ligand sogar vollständig verschwunden. Der OH_x-Ligand ist essentiell bei der CO-Oxidation, da er einen nukleophilen Angriff auf das Ni-gebundene CO durchführt und so die Entstehung des Ni-gebundenen Carboxylats herbeiführt. Eine schwache Ausprägung des OH_x-Liganden könnte daher mit einer verringerten Aktivität einhergehen.

Enzyme können bezüglich ihrer Übergangszustandenergiedifferenz ($\Delta\Delta G_{ES}^\ddagger$) verglichen werden (Gl. 7)

$$\Delta\Delta G_{ES}^\ddagger = -RT \ln \left[\frac{(k_{cat}/K_m)^1}{(k_{cat}/K_m)^2} \right] \quad (7)$$

Dabei stehen die Exponenten für die verschiedenen Enzyme, die verglichen werden. Dies erlaubt die Quantifizierung der thermodynamischen Beiträge struktureller Komponenten zur Katalyse (Copeland, 2000). Tatsächlich zeigt die K563A-Variante verglichen mit dem Wildtyp eine die Übergangszustandenergiedifferenz von 11.95 kJ mol⁻¹. K563 könnte daher im Übergangszustand der CO-Oxidation eine für die Reaktion essentielle Wasserstoffbrücke ausbilden.

Ein weiterer Rest, der als Bestandteil des Protonentransfernetzwerks der CODH/ACS_{Mt} identifiziert wurde, ist H116. Auch dieser Rest ist innerhalb der CODHs konserviert und entspricht H96 in CODH-II_{Ch}. Die strukturelle Untersuchung der H96D-Variante offenbarte keine Veränderungen des C-Clusters oder umliegender Seitenketten des D96. Trotzdem zeigte die Enzymvariante eine CO-Umsatzrate von nur 58 s⁻¹. Dies entspricht einer WT-Aktivität von 3 %. Ein Wassermolekül (nicht im Wildtyp vorhanden) kann nahe des D96 identifiziert werden, welches vermutlich in einem geringen Maße den Austausch des H96 durch Aspartat kompensieren kann. Zudem ist der hier ermittelte K_m-Wert von 2.7 μM geringer als der des Wildtyps. Das Michaelis-Menten Modell beschreibt die Enzymkinetik nach dem folgenden vereinfachten Mechanismus: Ein Enzym (E) bindet reversibel ein Substrat (S) und formt so einen Enzym-Substrat-Komplex (ES), welcher dann irreversibel das Produkt (P) und das freie Enzym (E) generiert (Gl. 8).



Dabei sind k_{+1} und k_{-1} Geschwindigkeitskonstanten, die die Assoziation bzw. Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes beschreiben. Die Geschwindigkeitskonstante k_{+2} wird auch als k_{cat} bezeichnet und beschreibt die Reaktion zum Produkt. Auf Basis des Michaelis-Menten-Modells lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung bilden, die nach der Michaelis-Konstante K_m aufgelöst werden kann (Gl. 8) (Fersht, 1999).

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \quad (8)$$

Die Verringerung des K_m -Werts der H96D-Variante ließe sich daher im Michaelis-Menten-Formalismus durch die Verringerung des k_{+2} bei gleichbleibenden Konstanten k_{+1} und k_{-1} erklären und deutet damit nicht notwendigerweise eine Erhöhung der Affinität für das Substrat an. Unter der Annahme, dass der Austausch des Histidin-Rests 96 durch Aspartat die CO-Oxidation (also die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1}) nicht beeinflusst, können die Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} und k_{-1} berechnet werden. Mit den ermittelten K_m - und k_{cat} -Werten des Wildtyps und der H96D-Variante können die Gleichungen 9 und 10 aufgestellt werden.

$$8.7 \mu\text{M} = \frac{k_{-1} + 1822 \text{ s}^{-1}}{k_{+1}} \quad (9)$$

$$2.7 \mu\text{M} = \frac{k_{-1} + 58 \text{ s}^{-1}}{k_{+1}} \quad (10)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 10 in Gleichung 9 ergibt sich so für k_{+1} eine Rate von $2.94 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und für k_{-1} eine Rate von 736 s^{-1} . Nach Gleichung 11 (Fersht, 1999) kann nun die Dissoziationskonstante (K_d) für CO berechnet werden, welche $2.5 \mu\text{M}$ beträgt.

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (11)$$

Im Michaelis-Menten-Formalismus entspricht also der K_m -Wert der H96D-Variante dem K_d , da der Umsatz im Vergleich zur Dissoziation vernachlässigt werden kann.

Wie in CODH/ACS_{Mt} ist H96 vermutlich Teil des Protonentransfernetzwerkes. Die geringe Umsatzrate deutet darauf hin, dass keine andere Seitenkette nahe des H96 dessen Funktion übernehmen kann.

In diesem Teil der Arbeit wurden Seitenketten nahe des C-Clusters, die einen Teil eines Protonentransfernetzwerks in CODH-II_{Ch} bilden könnten untersucht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Protonentransfernetzwerke in CODH/ACS_{Mt} und CODH-II_{Ch} ähnlich ausgeprägt sind. Eine wichtige Rolle spielen dabei in CODH-II_{Ch} K563 und H96, wobei H93 vermutlich für den Protonentransfer von geringerer Bedeutung ist.

3.1.3.3 Enzymvarianten des Gaskanals

Bei der CO-Oxidation muss neben dem Transport von Protonen und Elektronen auch der Transport von CO und CO₂ gewährleistet sein. Hydrophobe Kanäle stellen in CODH-II_{Ch} sicher, dass CO den C-Cluster erreicht (Dobbek *et al.*, 2001; Fessler, 2015). Das Isoleucin I567 befindet sich am Beginn eines dieser hydrophoben Kanäle und ist in einem Abstand von 5.4 Å zum Ni des C-Clusters lokalisiert. Es ist innerhalb der CODHs konserviert (Abb. 3.2) und könnte daher von Bedeutung bei der Katalyse des CO sein. In der CODH/ACDS aus *Methanosarcina barkeri* bindet Ni einen CO-Liganden in abgewinkelter Konformation (Gong *et al.*, 2008). Eine ähnliche Konformation konnte in der CN⁻-gebundenen Struktur (CN⁻ ist ein CO Analogon) der CODH/ACS_{Mt} identifiziert werden (Kung *et al.*, 2009). Nach einer Hypothese von Kung und Drennan könnte I567 daher die lineare Bindung des CO (bzw. CN⁻) an das Ni verhindern und so das CO-Molekül in die katalytisch günstigere abgewinkelte Position zwingen, durch welche die π -Rückbindung des Metallcarbonyls reduziert und so die Aktivierungsbarriere für die CO-Oxidation gesenkt werden könnte (Kung und Drennan, 2011). Drei Varianten des I567 wurden erzeugt, nämlich die I567L-, I567T- und I567A-Variante (Abb. 3.8). Der Austausch des I567 durch Leucin zeigte den geringsten Effekt. Strukturell konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden und mit einer CO-Umsatzrate von 1500 s⁻¹ erreicht die I567L-Variante nahezu Wildtyp-Aktivität. Es konnte allerdings ein erhöhter K_m -Wert von 86.8 μ M ermittelt werden (Tab. 3.2). Leucin ist wie Isoleucin eine ungeladene hydrophobe Seitenkette und bildet anstelle der *n*-Butylgruppe des Isoleucins eine Isobutylgruppe aus. Aufgrund dieser strukturellen und biochemischen Ähnlichkeit kann Leucin vermutlich teilweise die Funktion des Isoleucins übernehmen.

Auch der Austausch des I567 durch Threonin zeigte in Bezug auf die CO-Umsatzrate einen geringen Effekt. Strukturell unterscheidet sich die I567T-Variante nicht vom Wildtyp. Mit

einer Umsatzrate von 986 s^{-1} zeigte die Enzymvariante im Vergleich zum Wildtyp und zur I567L-Variante jedoch eine leicht verringerte Aktivität. Die Aminosäure Threonin unterscheidet sich vom Isoleucin durch die Ausbildung einer Alkoholgruppe. Es handelt sich daher um eine hydrophile, ungeladene Seitenkette, welche außerdem weniger Platz als Isoleucin oder Leucin beansprucht. Möglicherweise kann CO daher nicht die für die Katalyse optimale Position einnehmen oder erreicht diese nur unter erschwerten Bedingungen, sodass die CO-Umsatzrate sinkt. Interessanterweise ist der K_m Wert der I567T-Variante im Vergleich zum Wildtyp mit $19.8 \mu\text{M}$ nur leicht erhöht.

Tabelle 3.2: Kinetische Parameter des Wildtyps und der Enzymvarianten der CODH-II_{Ch}.

Enzymvariante	Ni-Besetzung	$k_{\text{cat}} [\text{s}^{-1}]$	$k_{\text{cat}}^n [\text{s}^{-1}]^*$	$K_m [\mu\text{M}]$	$k_{\text{cat}}^n / K_m [\text{s}^{-1} \text{ M}^{-1}]$	$\Delta\Delta G_{\text{ES}^\ddagger} [\text{kJ mol}^{-1}]$
-	0.56	1021	1822	8.7 ± 1.5	$2.09 \cdot 10^8$	-
I567L	0.51	765	1500	86.8 ± 10.9	$1.73 \cdot 10^7$	7.12
I567T	0.58	572	986	19.8 ± 3.2	$4.98 \cdot 10^7$	4.10
I567A	0.20	401	2006	12.4 ± 1.7	$1.62 \cdot 10^8$	8.19

* k_{cat} normalisiert anhand des Ni-Besetzungsgrads.

Einzig die I567A-Variante zeigt einen strukturellen Unterschied zum WT. In dieser Enzymvariante bildet das Ni-Atom zwei Positionen aus. In Position A (20 %) ist Ni wie im Wildtyp quadratisch-planar koordiniert. In Position B (25 %) hingegen kann eine pyramidale Koordination des Ni beobachtet werden. Wird die Aktivität unter Berücksichtigung des Besetzungsgrads der Position A normiert, erreicht die I567A-Variante eine CO-Umsatzrate von 2006 s^{-1} , die die des Wildtyps sogar übertrifft. Hier kommt die zweite mögliche Funktion des I567 zum Tragen, nämlich die Stabilisierung des C-Clusters. Durch den Austausch des I567 durch Alanin könnten die umgebenden Seitenketten C-Clusters eine erhöhte Flexibilität bekommen (Abb. 3.9). Letztendlich könnte sich dies auf die Stabilität des C-Clusters auswirken und wie hier beobachtet zu einer Destabilisierung des Ni führen.

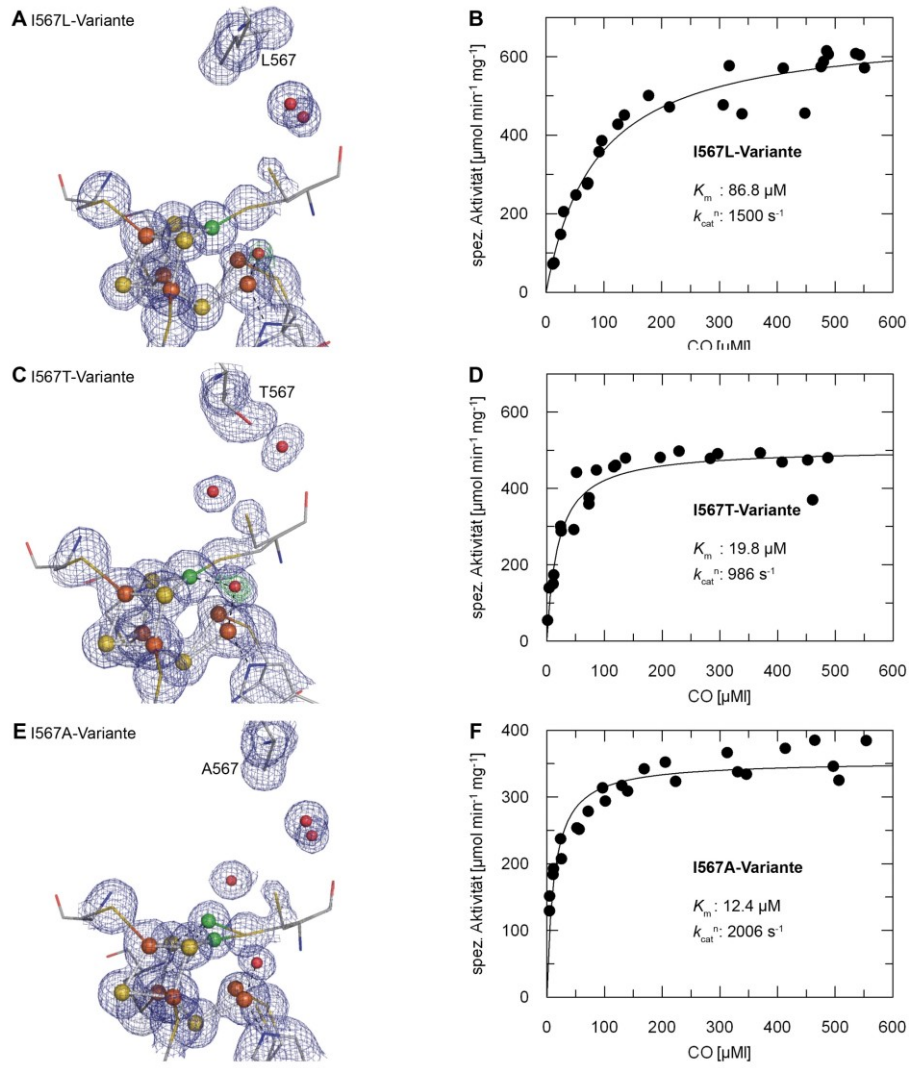


Abbildung 3.8: Strukturelle und kinetische Charakterisierung der Enzymvarianten des Gaskanals der CODH-II_{Ch}. Ni-Atome sind grün, Fe-Atome orange, S-Atome gelb und O-Atome rot dargestellt. 2F_o-F_c Elektronendichtekarten (blau) wurden bei 1.0 σ und F_o-F_c Elektronendichtekarten wurden bei 3 σ konturiert. CO-Oxidationsaktivitäten wurden bei 25 °C bestimmt. Die spezifische Aktivität für verschiedene CO-Konzentrationen wurde indirekt durch die Oxidation von MV spektralphotometrisch verfolgt. Die jeweiligen CO-Konzentrationen im Versuchsansatz wurden über die finale Absorption des MV ermittelt. Die Daten wurden einer nicht-linearen Regression mit der Michaelis-Menten-Gleichung unterzogen. Die ermittelte Umsatzrate k_{cat} (s. Tab. 3.2) wurde anhand der jeweiligen Ni-Besetzung normalisiert. (A) C-Cluster der I567L-Variante. (B) Michaelis-Menten Kinetik der I567L-Variante. (C) C-Cluster der I567T-Variante. (D) Michaelis-Menten Kinetik der I567T-Variante. (E) C-Cluster der I567A-Variante. (F) Michaelis-Menten Kinetik der I567A-Variante.

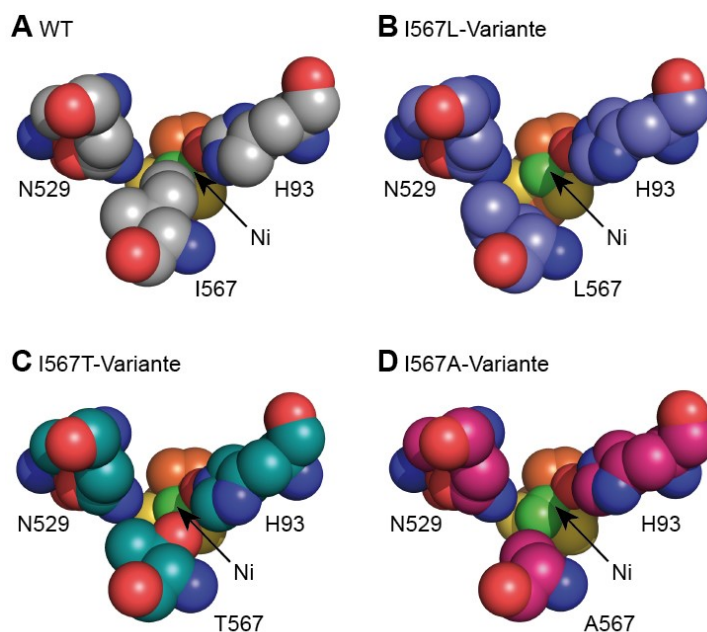


Abbildung 3.9: Umgebende Seitenketten des C-Clusters dargestellt als van-der-Waals-Sphären. (A) Wildtyp, (B) I567L-Variante, (C) I567T-Variante, (D) I567A-Variante. Blick von oben auf den Cluster aus der Perspektive des hydrophoben Gaskanals.

Die in diesem Teil der Arbeit erzielten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Seitenkette I567 zur Stabilisation umliegender Seitenketten und somit auch des C-Clusters bzw. Nickels beitragen könnte. Dies wird auch durch den Vergleich der katalytischen Effizienz der drei Enzymvarianten bestätigt. Die I567L- und I567T Variante zeigen eine um den Faktor 10 verringerte katalytische Effizienz. Die I567A-Variante erreicht nur unter der Bedingung, dass ihr k_{cat} anhand des Ni-Besetzungsgrads der Position A normalisiert wird, die katalytische Effizienz des Wildtyps.

3.1.3.4 Transformation des C-Clusters in einen [4Fe4S]-Cluster

Im *as isolated* Zustand der Wildtyp CODH-II_{Ch} stabilisieren die Seitenketten H261 und C295 die zwei alternativen Positionen des Fe₁. Dabei ist H261 für die Stabilisierung der stärker ausgeprägten Fe_{1A}-Position verantwortlich. Das C295 koordiniert die schwächer ausgeprägte Fe_{1B}-Position. Um einen Einblick zu bekommen, welche Veränderungen mit einem Austausch von Fe₁-koordinierenden Aminosäuren einhergehen, wurde in dieser Arbeit C295 der CODH-II_{Ch} durch Aspartat ausgetauscht und sowohl strukturell als auch kinetisch untersucht.

Die Auswirkungen des Austauschs von Fe₁-koordinierenden Seitenketten wurden bereits in einer früheren spektroskopischen Studie untersucht. So konnten für die Dithionit-reduzierte

H265V-Variante der CODH_{Rr} (entspricht H261 in CODH-II_{Ch}) die C_{red1} ($g_{av} = 1.86$) und C_{red2} ($g_{av} = 1.87$) typischen ESR-Signale nicht mehr identifiziert werden. Es wurde jedoch ein neuartiges ESR-Signal ermittelt ($g_{av} = 1.94$), welches dem B_{red}-Zustand ähnelte ($g_{av} = 1.84$) und durch Zugabe von CN⁻ aufgelöst werden konnte. Das Signal wurde demnach nicht vom B-Cluster hervorgerufen und die H265V-Variante könnte die Ausbildung eines [Fe₄S₄]-ähnlichen Clusters hervorrufen (Spangler *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 2002). Der Austausch der Fe₁-koordinierenden Seitenkette C295D der CODH-II_{Ch} konnte diese Vermutung nun bestätigen. Der Austausch des C295 durch Aspartat führt in CODH-II_{Ch} zu einer Reorganisation des C-Clusters. Der ursprüngliche [NiFe₄S₄OH_x]-Cluster bildet sich zu einem [Fe₄S₄]-Cluster um, in welchem das Fe₁ das Ni verdrängt. Dabei übernimmt das Fe₁ nicht die ursprüngliche Position des Nickels, sondern positioniert sich 1 Å unterhalb dieser, um den [Fe₄S₄]-Cluster zu komplettieren. Nahe des Fe₁ kann ein Wassermolekül identifiziert werden, welches sich jeweils in einem Abstand von 2.2 Å zum Fe₁ bzw. H261 befindet (Abb. 3.10). Durch anomale Diffraktionsexperimente konnte die Position des Fe₁ bestätigt werden. Ein Ni-Signal konnte an dieser Stelle nicht mehr identifiziert werden.

Die Beobachtung, dass der Austausch der Fe₁-koordinierende Seitenkette C295 eine Verringerung des Ni-Gehalts im Vergleich zum Wildtyp hervorruft und die CO-Oxidationsaktivität des Enzyms beseitigt, stimmt mit Studien der CODH_{Rr} und CODH-II_{Ch} überein, in welchen kinetisch die Relevanz der Fe₁-koordinierenden Seitenketten untersucht wurde. So konnte für die CODH_{Rr} gezeigt werden, dass die H265V-Variante (entspricht H261 in CODH-II_{Ch}) im Vergleich zum Wildtyp einen verringerten Nickel-Gehalt und eine verringerte CO-Oxidationsaktivität aufweist. Auch die H261A-, C295A- und C295E-Varianten der CODH-II_{Ch} wiesen einen verringerten Nickel-Gehalt im Vergleich zum Wildtyp auf. Die CO-Oxidationsaktivität, welche in dieser Studie nur für die C295E-Variante bestimmt wurde, war signifikant geringer als die des Wildtyps. Sowohl für H265V-Variante der CODH_{Rr} als auch für die C295E-Variante der CODH-II_{Ch} konnte zudem Hydroxylamin-Reduktaseaktivität festgestellt werden (Spangler *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 2002; Inoue *et al.*, 2013). Auch die hier untersuchte C295D-Variante könnte daher möglicherweise die Reduktion von Hydroxylamin katalysieren.

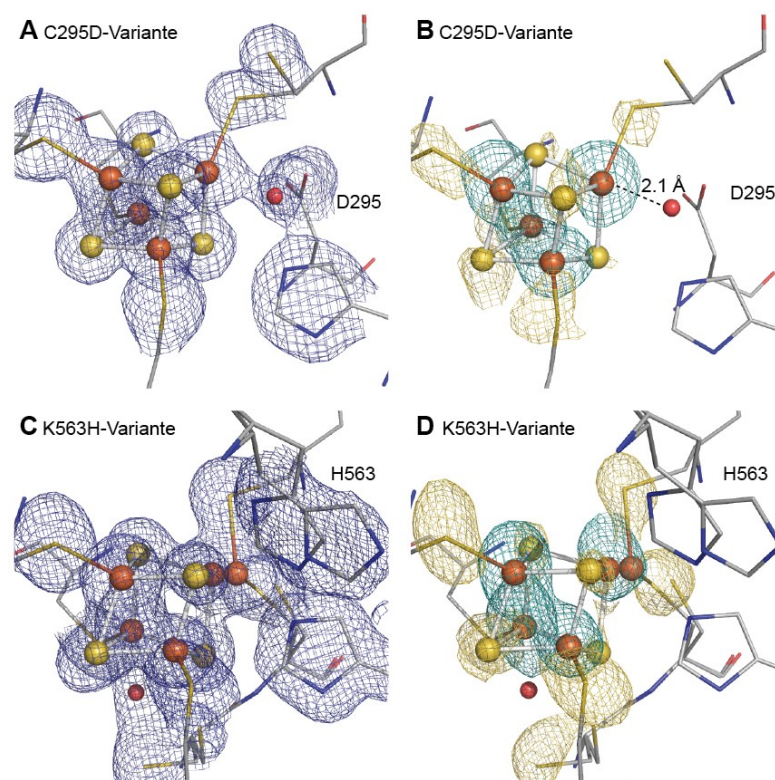


Abbildung 3.10: C-Cluster der C295D-Variante und K563H-Variante der CODH-II_{Ch} (Fe: orange, S: gelb, O: rot): Die 2F_o-F_c Elektronendichtekarten (blau) wurden bei 1.0 σ konturiert. (A) C-Cluster der C295D-Variante und 2F_o-F_c Elektronendichtekarte. (B) C-Cluster der C295D-Variante und anomale Differenz-Fourier-Dichtekarten. Die anomale Differenz-Fourier-Dichtekarte für Fe (cyan) wurde bei 4.0 σ und die für S (gelb) bei 3.5 σ konturiert. (C) C-Cluster der K563H-Variante und 2F_o-F_c Elektronendichtekarte. (D) C-Cluster der K563H-Variante und anomale Differenz-Fourier-Dichtekarten. Die anomale Differenz-Fourier-Dichtekarte für Fe (cyan) wurde bei 6.0 σ und die für S (gelb) bei 4.0 σ konturiert.

Interessanterweise kann die Ausbildung eines [Fe₄S₄]-Clusters nicht nur durch den Austausch der Fe₁-koordinierenden Seitenketten der 1. Koordinationssphäre, sondern auch durch den Austausch von Seitenketten der 2. Koordinationssphäre ausgelöst werden. So bildet sich durch den Austausch des Lysin-Rests K563 durch Histidin ebenfalls ein [Fe₄S₄]-Cluster. Das Fe₁ der K563H-Variante ist im Vergleich mit dem Fe₁ der C295D-Variante jedoch flexibler. Vermutlich resultiert dies aus der Flexibilität des H563, welches zwei Konformationen ausbildet und so das Fe₁ nicht vollständig stabilisieren kann. Der Histidin-Rest H563 begünstigt die B-Position des Fe₁ und verdrängt dabei den OH_x-Liganden. Der Cystein-Rest Cystein C526 koordiniert nun anstelle des Nickels die Fe_{1B}-Position. Die Fe_{1A}-Position wird vom Cystein-Rest C295 koordiniert. An der ursprünglichen Stelle des Ni konnte positive Elektronendichte identifiziert werden, welche von nickelgebundenen Spezies herrühren könnte. Obwohl in anomalen Diffraktionsexperimenten an der Stelle des

Fe_1 kein Ni-Signal identifiziert werden konnte, zeigte die K563H-Variante eine CO-Umsatzrate von 10 s^{-1} . Diese könnte durch einen kleinen Teil aktiver CODH-Spezies, welche Ni enthält, verursacht werden. Um zu klären, ob die Aktivität durch verbliebenes Nickel verursacht wird, sollte der Nickel-Gehalt der Enzymvariante mit Hilfe einer alternativen Methode wie z.B. ICP-OES (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) ermittelt werden.

Verglichen mit dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ B-Cluster des CODH-II_{Ch} Wildtyps bildet sich durch den Austausch des K563 bzw. C295 kein „echter“ $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster aus (der Austausch hat keinen Einfluss auf die Ausprägung des B- und D-Clusters der C295D-Variante). Die Fe-S-Bindungen innerhalb des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ B-Clusters betragen ca. 2.2-2.3 Å. In der K563H Variante bewegen sich alle Bindungslängen bis auf die $\text{Fe}_1\text{-S}_3$ -Bindung in diesem Rahmen (vgl. Anhang, Tab. A.1). Für die Fe_{1A} und Fe_{1B} -Positionen der K563H-Variante wurden Abstände von 2.39 Å bzw. 2.61 Å gemessen (Abb. 3.11). Auch in der C295D-Variante bewegen sich die meisten Bindungslängen in einem Rahmen von 2.2-2.3 Å. Für die $\text{Fe}_1\text{-S}_3$ -Bindung und $\text{Fe}_1\text{-S}_4$ -Bindung wurden jedoch Bindungslängen von 2.35 Å bzw. 2.38 Å gemessen.

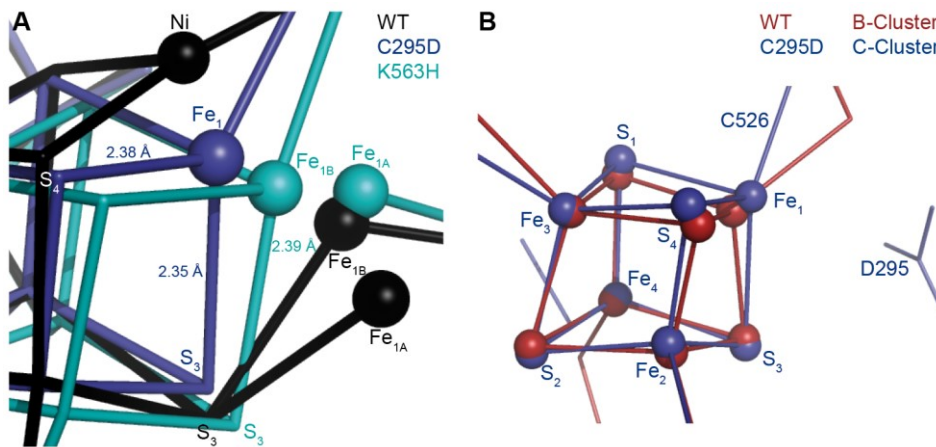


Abbildung 3.11: (A) Vergleich des CODH-II_{Ch} Wildtyp C-Clusters mit dem C-Cluster der C295D- und K563H-Variante. (B) Vergleich des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ B-Clusters der CODH-II_{Ch} mit dem C-Cluster der C295D-Variante.

Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang mit vorigen Studien, scheint der C-Cluster durch ein Zusammenspiel von Proteinresten der 1. und 2. Koordinationssphäre stabilisiert zu werden. Interessanterweise ist dabei nicht das Nickel-kordinierende C526 von ausschlaggebender Bedeutung. So zeigte die C531A-Variante der CODH_{Rr} (C526 in CODH_{Ch}) eine dem Wildtyp ähnliche Metallzusammensetzung des C-Clusters. C531 könnte eher von Bedeutung bei der CO-Katalyse sein, da für diese Enzymvariante eine geringere

spezifische Aktivität und ein geringerer K_m -Wert als im Wildtyp festgestellt werden konnte (Staples *et al.*, 1999). Ausschlaggebend für die korrekte Insertion des Ni scheint die Stabilisierung des Fe₁ zu sein. Eine besondere Bedeutung kommt dabei H261 und C295 zu. Allerdings tragen auch die im vorigen Kapitel (3.1.3.2) besprochenen Seitenketten H93 und K563 zur Stabilisierung des C-Clusters bei. Ohne eine strukturelle Verankerung des Fe₁ nimmt der C-Cluster eine vermutlich stabilere Form an, die einem [Fe₄S₄]-Cluster ähnelt.

3.1.4 CODH-II und O₂

3.1.4.1 Einfluss von O₂ auf die CO-Oxidationsaktivität der CODH-II

Obwohl die Sauerstoffempfindlichkeit der CODHs ihre praktische Anwendung begrenzt, wurde diese Eigenschaft in vergleichsweise wenigen wissenschaftlichen Studien untersucht. Für CODH/ACS_{Mt} wurde beobachtet, dass diese nach 30 min O₂-Inkubation sämtliches Nickel und auch ihre CO-Oxidationsaktivität verliert (Drake, 1982). CODH_{Rr} wird sogar schon nach 10 s O₂-Inkubation vollständig inaktiviert (Bonam *et al.*, 1984). Auch die native CODH-I_{Ch} und die native CODH-II_{Ch} verlieren ihre Aktivität, wenn sie Luftsauerstoff ausgesetzt werden. Für sie konnten Halbwertszeiten von 20 min bzw. 60 min bestimmt werden (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Interessanterweise kann die CODH durch Reduktion nach O₂-Exposition zumindest teilweise wieder reaktiviert werden (Wang *et al.*, 2015; Merrouch *et al.*, 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CODH-II_{Ch} durch O₂ inaktiviert wird. CODH-II_{Ch} wurde bei 18 °C mit O₂ inkubiert und daraufhin bei 25 °C mittels DT und DTT über einen Zeitraum von einer Stunde wieder reaktiviert. Ähnlich der nativen CODH-II_{Ch}, hat die hier verwendete rekombinante CODH-II_{Ch} bereits nach 45 min die Hälfte ihrer CO-Oxidationsaktivität verloren (Abb. 3.12). Unterschiedliche Oberfläche/Volumen-Verhältnisse der Proteinlösung können hier zu einer stärkeren bzw. schwächeren Inkubation mit O₂ führen. Um eine Korrelation zwischen den Versuchen im Kristall und in Lösung herstellen zu können, wurden daher Versuchsbedingungen gewählt, die dem Aufbau der Versuche im Kristall möglichst ähnelten. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die hier erzielten Ergebnisse nicht 1:1 auf die Ergebnisse im Kristall übertragen werden können, da die Kristallpackung einen erheblichen Einfluss auf die O₂-Exposition des Enzyms haben könnte.

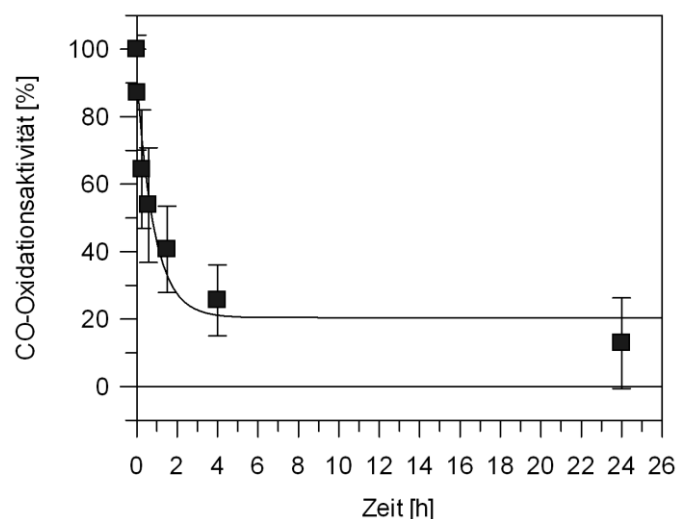


Abbildung 3.12: Einfluss von O_2 auf die spezifische CO-Oxidationsaktivität der CODH-II_{Ch}. CODH-II_{Ch} Proben wurden bei 18 °C mit O_2 inkubiert und daraufhin bei 25 °C für 1 h reaktiviert. Die ermittelte Halbwertszeit der Inaktivierung beträgt 45 min. Die Messung der spezifischen CO-Oxidationsaktivität erfolgte bei 25 °C, pH 8. Die spezifische Aktivität ohne Sauerstoffeinfluss wurde als 100 % definiert.

3.1.4.2 Einfluss von O_2 auf den C-Cluster

Über einen Zeitraum von 24 Stunden wurde *in crystallo* der Einfluss von O_2 auf den $[NiFe_4S_4OH_x]$ C-Cluster der CODH-II_{Ch} untersucht. Als Ausgangszustand der Behandlung wurde der –600 mV Zustand gewählt, um eine vollständige Reduktion und Synchronisation aller Zustände im Kristall zu gewährleisten. Der C-Cluster der CODH-II_{Ch} ist ein $[NiFe_4S_4OH_x]$ -Cluster, bestehend aus einem $[NiFe_3S_4]$ -Kern und einem *exo*-Fe, welches einen OH_x -Liganden bindet (Abb. 3.13). Die Organisation des Clusters konnte durch Aufnahme entsprechender anomaler Datensätze verifiziert werden (Abb. 3.14). Der Kern des Clusters wird von den vier Cystein-Resten (C333, C446, C476, C526) koordiniert. Das *exo*-Fe wird von einem Cystein-Rest (C295) und einem Histidin-Rest (H261) koordiniert. Fe- und S-Atome weisen einen Besetzungsgrad von 60-70 % auf, wohingegen das Ni-Atom zu 50 % besetzt ist. Die B-Faktoren aller Metalle liegen bei ca. 10 Å³. Der Cluster befindet sich ca. 18 Å unterhalb der Proteinoberfläche und wird über einen hydrophoben Tunnel, welcher den Transport von CO und CO₂ sicherstellt, mit dieser verbunden (Dobbek *et al.*, 2001; Jeoung und Dobbek, 2007; Fessler, 2015). Da O_2 ähnliche Dimensionen wie CO bzw. CO₂ hat, kann es ebenfalls über das hydrophobe Tunnelsystem zum C-Cluster gelangen.

Bereits nach einer Minute Inkubation mit O_2 lassen sich erste Veränderungen am C-Cluster beobachten. Diese Veränderungen werden vermutlich durch die Übertragung von

Elektronen des C-Clusters auf die O₂-Moleküle ausgelöst. So können z.B. die [Fe₄S₄]-Cluster von Flavinen und Chinonen Elektronen auf O₂ übertragen und dabei O₂⁻ bzw. H₂O₂ generieren (Messner und Imlay, 1999; Messner und Imlay, 2002). O₂⁻ und H₂O₂ können wiederum mit Fe³⁺/Fe²⁺ in der Fenton-Reaktion das HO• Radikal bilden (Liochev und Fridovich, 1994; Keyer und Imlay, 1996). Es kann daher in diesem Experiment nicht ausgeschlossen werden, dass neben O₂ weitere reaktive Sauerstoffspezies wie O₂⁻, H₂O₂ oder HO• zur Schädigung des C-Clusters beitragen bzw. den Verlauf der Schädigung beschleunigen.

Zu beobachten sind zunächst zwei Phänomene. Erstens bildet sich eine alternative Position des Fe₄ aus, welche durch den Cystein-Rest C294 stabilisiert wird. Zweitens bindet der Cluster anstelle des OH_x-Liganden einen Sulfid-Liganden. Dobbek *et al.* identifizierten in der nativen CODH-II_{Ch} eine Sulfid-gebundene CODH-Spezies (Dobbek *et al.*, 2001), deren physiologische Relevanz Gegenstand von Diskussionen war (Dobbek *et al.*, 2004; Feng und Lindahl, 2004a, 2004b). Schließlich wurde die Sulfid-gebundene Struktur jedoch als katalytisch aktive Form ausgeschlossen (Jeoung und Dobbek, 2007). Elektrochemische Studien zeigten, dass der Cluster bei Potenzialen höher als -50 mV durch Abgabe eines Elektrons in den intermediären C'_{ox}-Zustand übergehen kann. Von diesem Zustand kann der Cluster in den C_{ox}-Zustand übergehen oder durch Sulfid inaktiviert werden und den C_s-Zustand annehmen. Durch Anlegen eines negativen Potenzials können der C_{ox}- (Potenziale < -50mV) und der C_s-Zustand (Potenziale < -250 mV) wieder aufgelöst und der Großteil der Aktivität des Enzyms wiederhergestellt werden. (Wang *et al.*, 2013b) Die elektrochemische Untersuchung des C_{ox}-Zustands zeigte zudem, dass die CODH in ihrer oxidierten Form besser O₂-induzierten Schäden widerstehen kann als in ihrer reduzierten Form (Wang *et al.*, 2015). Möglicherweise schützt auch der C_s-Zustand die CODH-II_{Ch} vor oxidativer Beschädigung. So könnte CODH-II_{Ch} unter O₂-Einfluss diesen Zustand annehmen und nach Entfernung des O₂ wieder reaktiviert werden. Fraglich ist jedoch der Ursprung des Sulfid-Liganden. In diesem Experiment könnte der Sulfid-Ligand durch frei gewordenen S-Atome, die durch die Zerstörung des Clusters entstehen, gebildet werden.

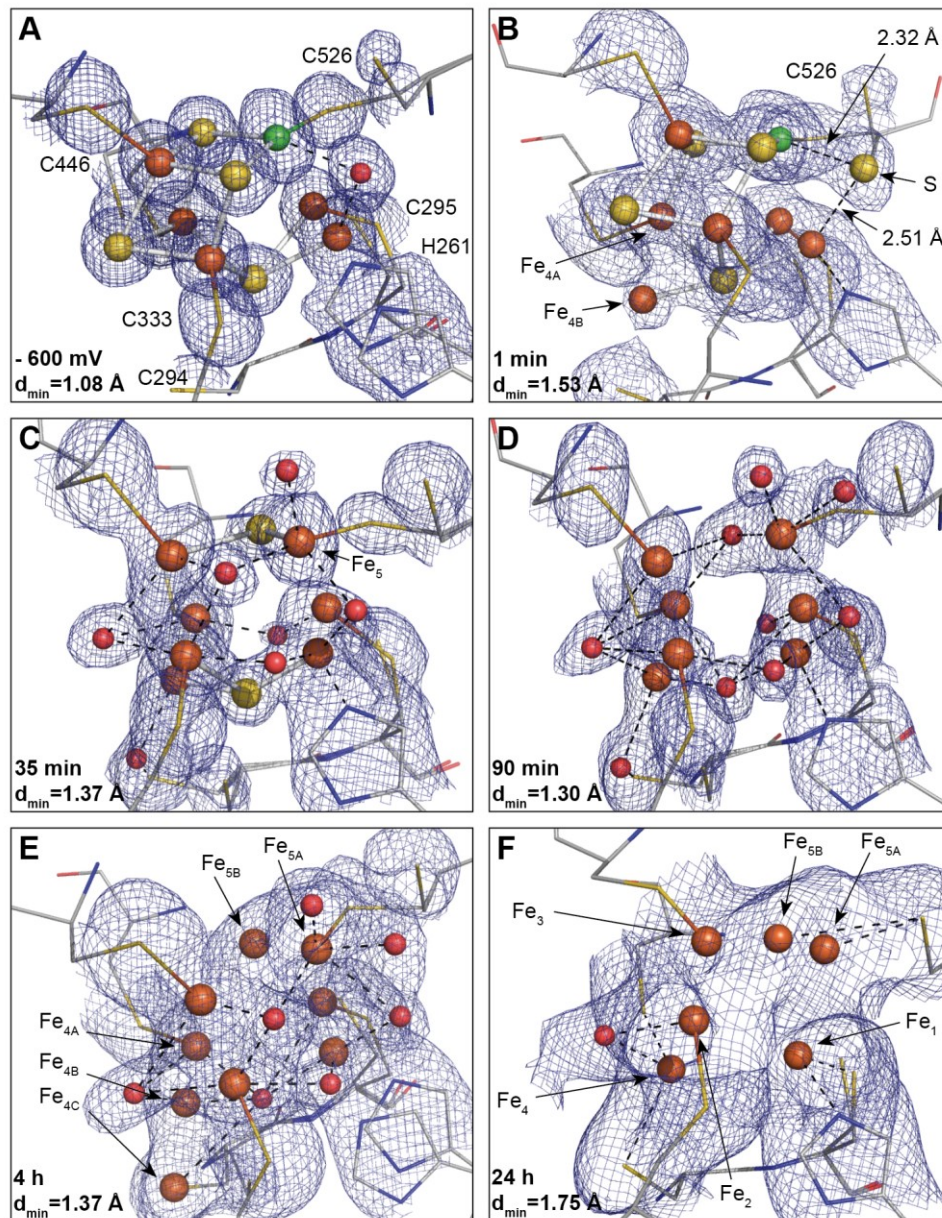


Abbildung 3.13: Darstellung der Zerstörung des C-Clusters der CODH-II_{Ch} (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb; O: rot) durch O₂. Die 2F_o-F_c Elektronendichtekarten (blau) wurden bei 1.0 σ konturiert. (A) -600 mV Ausgangszustand. (B) C-Cluster nach 1 min O₂-Behandlung. (C) C-Cluster nach 35 min O₂-Behandlung. (D) C-Cluster nach 90 min O₂-Behandlung. (E) C-Cluster nach 4 h O₂-Behandlung. (F) C-Cluster nach 24 h O₂-Behandlung. Die C-Cluster der verschiedenen Abbildungen sind in ähnlicher Orientierung ausgerichtet.

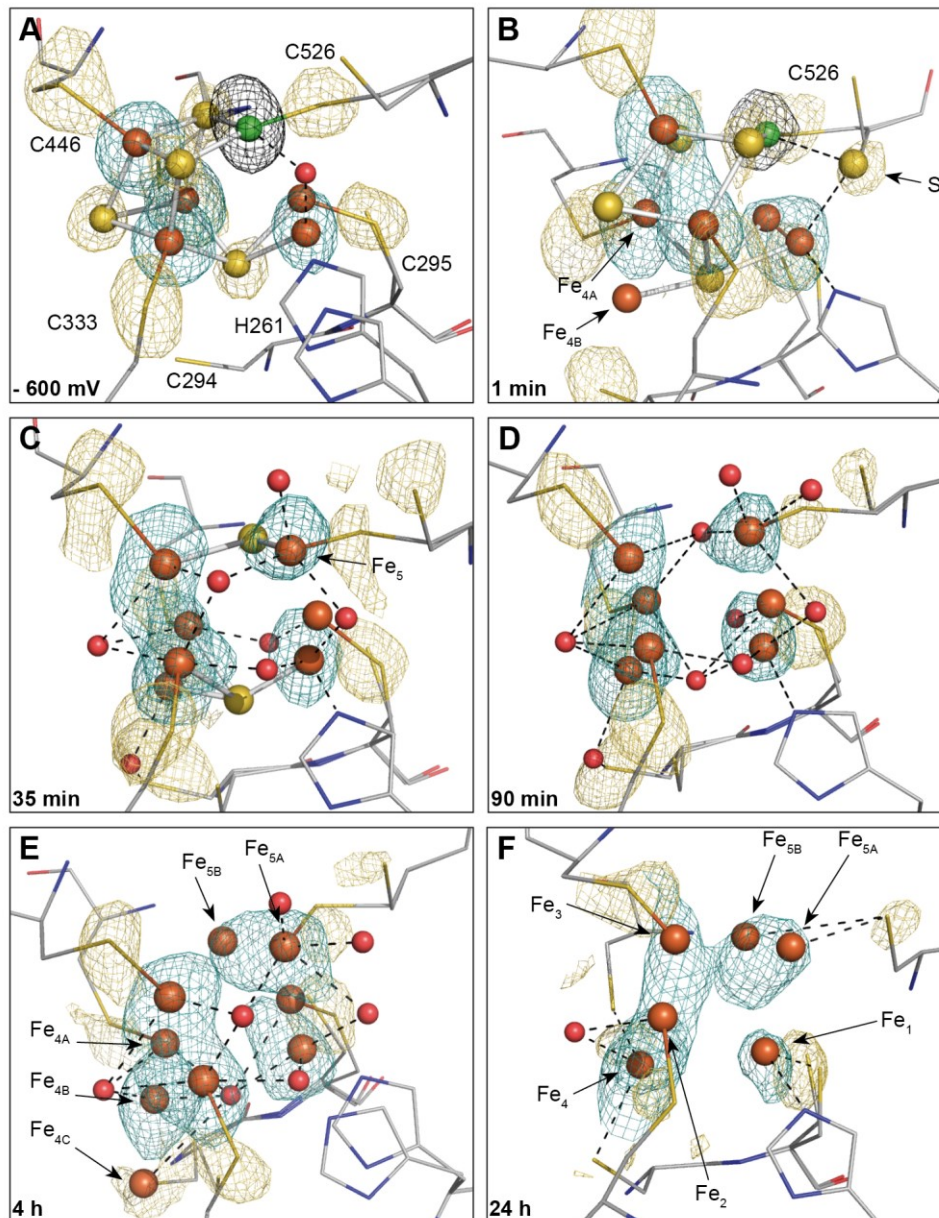


Abbildung 3.14: Darstellung der Zerstörung des C-Clusters der CODH-II_{Ch} (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb; O: rot) durch O₂. Abgebildet sind die anomalen Differenz-Fourier-Karten für Ni (schwarz), Fe (cyan) und S (gelb). (A) -600 mV Ausgangszustand. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Ni bei 9.0 σ , für Fe bei 9.0 σ und für S bei 4.5 σ konturiert. (B) C-Cluster nach 1 min O₂-Behandlung. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Ni bei 5.9 σ , für Fe bei 5.9 σ und für S bei 4.0 σ konturiert. (C) C-Cluster nach 35 min O₂-Behandlung. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe bei 4.0 σ und für S bei 3.0 σ konturiert. (D) C-Cluster nach 90 min O₂-Behandlung. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe bei 5.0 σ und für S bei 4.5 σ konturiert. (E) C-Cluster nach 4 h O₂-Behandlung. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe bei 5.0 σ und für S bei 4.0 σ konturiert. (F) C-Cluster nach 24 h O₂-Behandlung. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe bei 4.0 σ und für S bei 3.0 σ konturiert. Die C-Cluster der verschiedenen Abbildungen sind in ähnlicher Orientierung ausgerichtet.

Der hier beschriebene mutmaßliche Schutzmechanismus greift nur kurzzeitig. Langfristige Sauerstoffinkubation führt zu einer fortschreitenden Schädigung des C-Clusters. Bereits 35 min nach Beginn der Inkubation kann der Sulfid-gebundene Zustand nicht mehr identifiziert werden, sodass hier ein OH_x -Ligand modelliert wurde (W_1). Zwei Szenarien sind denkbar, der Sulfid-Ligand könnte tatsächlich durch die andauernde Inkubation mit Sauerstoff verdrängt worden sein oder aber es liegt im Kristall eine Sulfid-Wasser-Mischform vor. Anomales Schwefelsignal ist mit der verwendeten Versuchsausrüstung schwer zu identifizieren, da die Schwefel K-Kante bei 5.0155 \AA nicht erreicht werden kann. Datensätze wurden bei einer Wellenlänge von 1.883 \AA aufgenommen, bei welcher nur ein schwaches Schwefel-Signal detektiert werden kann (Für Schwefel konnten 0.003 e/\AA^3 detektiert werden. Im Vergleich dazu liegt das Fe-Signal bei 0.012 e/\AA^3). Zusätzlich wird die Identifikation des Sulfid-Liganden durch die Destabilisierung des Clusters und die höhere resultierende Beweglichkeit der involvierten Atome erschwert. Dieselben Annahmen treffen auch auf S_2 und S_4 zu, welche im Modell durch Wasser ersetzt wurden. Für sie kann kein anomales Signal mehr identifiziert werden und auch die zwei verbleibenden S-Atome, S_1 und S_3 , weisen ein nur noch schwaches anomales Signal auf. Die Zerstörung des C-Clusters ist somit vor allem durch das Verschwinden der verbindenden Schwefel-Liganden gekennzeichnet. Ähnliche Erkenntnisse wurden auch von Nicolet *et al.* gewonnen, die für den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster des Maturaseproteins HydE einen schwefelbasierten Zerfallprozess beschrieben haben (Nicolet *et al.*, 2013).

Ein weiteres Merkmal der Zerstörung des C-Clusters ist der Austausch des Ni durch Fe (Fe_5). Dieser Austausch hat gravierende Auswirkungen auf die katalytische Aktivität des Clusters, da am Ni die CO/CO_2 Konversion katalysiert wird. So konnte z.B. für CODH_{Mt} gezeigt werden, dass 30 min Inkubation mit Sauerstoff den Verlust des Nickels und der CO-Oxidationsaktivität hervorrufen (Drake, 1982). Der Ni-Besetzungsgrad spiegelt sich auch in der Ausprägung der zwei Konformationen des koordinierenden Cystein-Rests C526 wider. Im Grundzustand dominiert die Ni-koordinierende A-Konformation (C526_A : 80 %, C526_B : 20 %). Schwindet die Ni Besetzung bzw. wird Ni durch Fe ersetzt überwiegt die B-Konformation (C526_A : 40 %, C526_B : 60 %). Durch das Verschwinden der Schwefel und den Austausch des Ni durch Fe, kann der Cluster in einen oberen Teil, bestehend aus dem verbliebenen S_1 und den beiden Fe-Atomen Fe_3 und Fe_5 , und einen unteren Teil, bestehend aus dem verbliebenen S_3 und den beiden Fe-Atomen Fe_2 und Fe_4 , gegliedert werden, wobei Fe_4 in zwei Positionen vorliegt. Wiederum muss hier auf die Möglichkeit einer Schwefel-

Wasser-Mischform hingewiesen werden. Das Fe₁ besetzt weiterhin zwei Positionen und wird von den Seitenketten H261 und C295 koordiniert.

Der weitere Ablauf des Zerfalls ist gekennzeichnet durch das Verschwinden der übrigen S-Atome. Fe₅ besetzt eine zweite Position und nimmt so den frei gewordenen Raum des S₁ ein. Weitere frei gewordenen Räume werden durch Wasser besetzt. Das Fe₄ schreitet in seiner Destabilisierung voran und zeigt eine weitere Position. Nach 24 h ist schließlich ein Zustand erreicht, in welchem nur die Fe-Atome verblieben sind. In diesem Experiment wurde der weitere Abbau des Clusters nicht verfolgt. Es ist wahrscheinlich, dass das Protein durch den Abbau der restlichen Fe-Atome schließlich seine Apoform erreicht.

Verglichen mit Studien, welche den sauerstoffinduzierten Zerfall von [Fe₄S₄]-Clustern beschreiben ist dieser Ablauf ungewöhnlich. Bisherige Untersuchungen zeigen den Zerfall von [Fe₄S₄]-Clustern (in manchen Fällen unter Ausbildung eines [Fe₃S₄]-Intermediats) zu einem [Fe₂S₂]-Cluster, welcher dann weiter abgebaut werden kann. So wandelt sich der [Fe₄S₄]²⁺-Cluster der Aconitase unter Sauerstoffeinfluss zunächst in einen [Fe₄S₄]³⁺-Cluster um, welcher dann zu einem [Fe₃S₄]¹⁺-Cluster abgebaut wird (Flint *et al.*, 1993a). Auch für das regulatorische Protein FNR wird ein ähnlicher Mechanismus diskutiert, welcher in der vollständigen Zerstörung des Clusters mündet (Zhang *et al.*, 2012). Für das Radikalenzym Biotin-Synthase (Duin *et al.*, 1997), das Gerüstprotein IscU (Chandramouli *et al.*, 2007), die Histidin-Kinase NreB (Müllner *et al.*, 2008) und die Maturase HydE (Nicolet *et al.*, 2013) wurde unter Sauerstoffeinfluss die Ausbildung eines [Fe₂S₂]-Clusters beobachtet. In CODH-II_{Ch} konnten keine derart geordneten Prozesse ermittelt werden. Allerdings wurden drei zentrale Charakteristika des Zerfalls identifiziert, nämlich die Ausbildung eines [NiFe₄S₄-S]-Intermediats begleitet von einer Positionsänderung des Fe₄, der Austausch des Ni durch Fe und der Abbau der S-Atome.

3.1.4.3 Der oxidierte Zustand (C_{ox}) des C-Clusters

Um die oxidativen Veränderungen des C-Clusters von den sauerstoffinduzierten Beschädigungen unterscheiden zu können, wurde der reduzierte C-Cluster im -600 mV-Zustand mit dem Oxidationsmittel Thionin (E'₀ = 56 mV) oxidiert und daraufhin wiederum mit Ti³⁺-Citrat in den -600 mV-Ausgangszustand versetzt. Spektroskopisch wurde der C_{ox}-Zustand bereits für die CODH_{Mt} und die CODH_{Rr} untersucht. Als Oxidationsmittel diente auch hier Thionin (Feng und Lindahl, 2004a). Der C-Cluster ist im oxidierten Zustand diamagnetisch und geht bei Aufnahme eines Elektrons in den paramagnetischen C_{red1}-Zustand über. Für die C_{ox}/C_{red1} Konversion wurde in CODH_{Mt}

ein Mittelpunktspotenzial von -110 mV und für CODH_{Rr} ein Mittelpunktspotenzial von -220 mV ermittelt (Lindahl *et al.*, 1990a; Spangler *et al.*, 1996). In elektrochemischen Untersuchungen der CODH-I_{Ch} wurde ein intermediärer C'_{ox}-Zustand postuliert, welcher bei Potenzialen über -50 mV entsteht und dann in den C_{ox}-Zustand übergehen kann (Wang *et al.*, 2013b). In Abbildung 3.15 ist der C-Cluster der CODH-II_{Ch} während des Reduktions-Oxidations-Zyklus dargestellt.

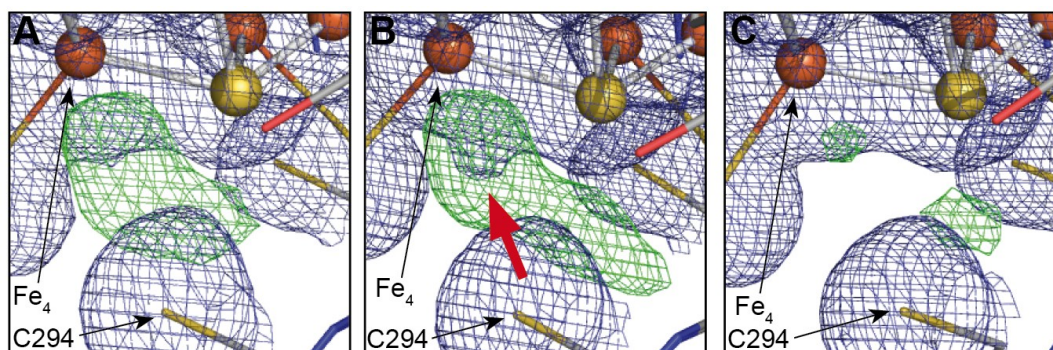


Abbildung 3.15: Reduktion, Oxidation und Reduktion der CODH-II_{Ch}. Ein CODH-II_{Ch} Kristall wurde zunächst mit Ti³⁺-Citrat reduziert (A), daraufhin mit Thionin oxidiert (B) und schließlich nochmals mit Ti³⁺-Citrat reduziert (C). Der rote Pfeil in (B) markiert die oxidative Veränderung des Clusters. Die 2F_o-F_c (blau) und F_o-F_c (grün) Elektronendichtekarten wurden bei 1.0 σ bzw. 3.0 σ konturiert. Fe-Atome sind orange und S-Atome gelb dargestellt.

Zur Reduktion des Clusters wurde Ti³⁺-Citrat, welches den -600 mV bzw. C_{red2}-Zustand erzeugt, verwendet, um eine vollständige Reduktion des Clusters zu gewährleisten. Um den C_{ox}-Zustand zu erreichen muss der Cluster demnach drei Elektronen abgeben. Wie in Abbildung 3.15 erkennbar ist führte die Inkubation mit Ti³⁺-Zitrat nicht zu einer vollständigen Reduktion des Clusters. Bei Oxidation mit Thionin konnte jedoch zusätzliche Elektronendichte nahe des Fe₄ identifiziert werden, welche vermutlich durch eine Destabilisierung des Fe₄ hervorgerufen wird. Der Kristall wurde mit 0.5 mM Thionin für 10 min inkubiert. Vermutlich könnte mit einer längeren Inkubationszeit oder einem weniger reduzierten Behandlungsstartpunkt (z.B. der -320 mV-Zustand) ein besser definierter oxidierten Zustand erzielt werden. Zu beachten ist hier jedoch, dass höhere Thioninkonzentrationen und längere Inkubationszeiten in Vorexperimenten zum Verlust der Diffraktion führten. Nach Inkubation mit dem Reduktionsmittel Ti³⁺-Citrat verschwindet die zusätzliche Elektronendichte nahe des Fe₄ und der ursprüngliche reduzierte Zustand des Clusters wird wieder erreicht. Die Reversibilität des beobachteten Zustands deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Zustand um den bereits spektroskopisch und elektrochemisch

charakterisierten C_{ox} -Zustand handeln könnte. Es sind jedoch weitere Experimente nötig, um den C_{ox} -Zustand zweifelsfrei identifizieren zu können.

3.1.4.4 Einfluss von O_2 auf den CN^- -gebundenen Zustand des C-Clusters

CN^- , ein isoelektronisches CO Analogon bindet im C_{red1} -Zustand der CODH und inhibiert deren CO-Oxidationsaktivität (Lindahl, 2002). Kristallographisch wurde die CN^- -Bindung bereits untersucht und es konnten zwei Bindungsmodi des CN^- identifiziert werden. In der CODH/ ACS_{Mt} bindet CN^- in einer verzerrt tetrahedralen Koordination an das Ni (Kung *et al.*, 2009). In der CODH-II $_{Ch}$ hingegen bindet CN^- nahezu linear an die offene apikale Koordinationsstelle des Ni (Jeoung und Dobbek, 2009). Die Reversibilität dieser Bindung konnte durch kinetische, spektroskopische und elektrochemische Studien belegt werden (Ensign *et al.*, 1989; Anderson und Lindahl, 1996; Wang *et al.*, 2013b). Elektrochemische Studien zeigten zudem, dass CN^- den C-Cluster vor irreversiblen Schäden durch O_2 schützen kann (Wang *et al.*, 2015). Um einen strukturellen Einblick in die mögliche Schutzfunktion des CN^- zu erhalten, wurden Kristalle in den -320 mV-Zustand + CN^- versetzt und 35 min mit O_2 inkubiert. Die Behandlung der Kristalle im -320 mV Zustand mit Cyanid erzeugte den CN^- -gebundenen Zustand des C-Clusters. Das Cyanid-Anion bindet, wie von Jeoung und Dobbek beschrieben (Jeoung und Dobbek, 2009), an der offenen Koordinierungsstelle des Ni und komplettiert so dessen quadratisch-planare Koordination. Durch diese Bindung geht der OH_x -Ligand verloren und das Fe_1 -Atom, welches im -320 mV Zustand den OH_x -Liganden bindet, besetzt zu einem höheren Grad seine B-Position. Dieser Vorgang ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Ni und CN^- sind jeweils zu 50 % besetzt. Hohe CN^- -Konzentrationen können den C-Cluster zerstören (Ciaccafava *et al.*, 2016). Daher wurde eine niedrige CN^- Konzentration gewählt (4.5 mM) und die Kristalle wurden vor Inkubation mit O_2 in CN^- -freien Puffer transferiert. Die 35-minütige Inkubation der Kristalle mit O_2 resultierte in der Zerstörung des C-Clusters. Der Cluster ähnelt dem Zustand, welcher unter der oben beschriebenen O_2 -Inkubation nach 35 min erreicht wurde. Das Fe_4 bildet eine alternative Position aus und die Schwefel-Atome S_1 , S_2 , S_3 sowie das Ni-Atom können nicht mehr identifiziert werden. An die Stelle des Nickels ist ein Fe-Atom getreten (Fe_5).

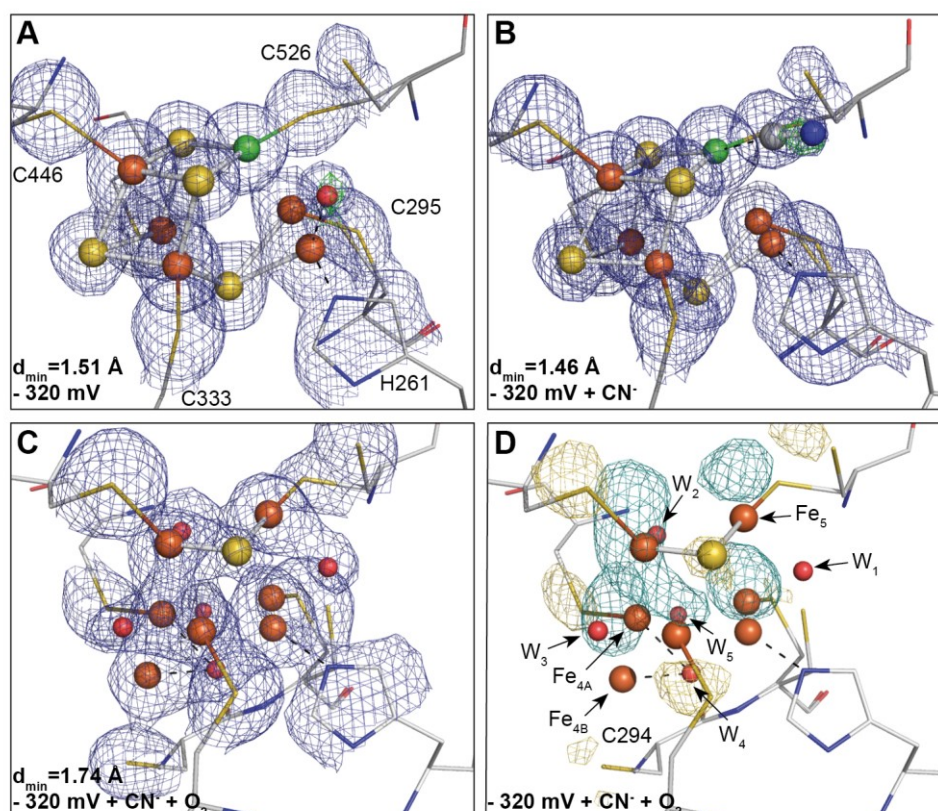


Abbildung 3.16: Einfluss von O_2 auf den CN^- -gebundenen Zustand des C-Clusters (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb, O: rot) der CODH-II_{Ch}. C-Cluster im -320 mV Zustand (A) und gebunden mit CN^- (B) Die Behandlung mit O_2 zerstört den CN^- -gebundenen C-Cluster (C). Anomale Differenz-Fourier-Karten des zerstörten Clusters (D). Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe (cyan) bei 5.0σ und für S (gelb) bei 3.0σ konturiert. Die $2F_o - F_c$ Elektronendichtekarten (blau) wurde bei 1.0σ und die $F_o - F_c$ Elektronendichtekarte (grün) bei 3.0σ konturiert.

CN^- inhibiert die CO-Oxidation bei Potenzialen von +200 mV bis ca. -650 mV. Erst bei Potenzialen unterhalb von -760 mV konnte eine Reaktivierung des Enzyms beobachtet werden (Wang *et al.*, 2013b; Wang *et al.*, 2013c). Es ist daher unwahrscheinlich, dass sich CN^- aufgrund der Erhöhung des Potenzials in der Lösung durch O_2 vom Cluster gelöst und somit den Cluster Angriffen durch O_2 ausgeliefert hat. Ausschlaggebend für die hier beobachtete Zerstörung des C-Clusters ist vermutlich der unterschiedliche experimentelle Aufbau des elektrochemischen und des hier durchgeführten kristallographischen Experiments. Im elektrochemischen Versuch wurde das Enzym auf einer Elektrode immobilisiert, mit CN^- behandelt und bei einem gleichbleibenden reduktiven Potenzial von -260 mV mit O_2 inkubiert. Eine andauernde Reduktion des Proteins bei gleichzeitiger O_2 -Inkubation wurde in diesem Experiment nicht durchgeführt (könnte aber durch Zugabe von DTT oder 2-Mercaptoethanol während der O_2 -Inkubation erreicht werden). Vermutlich kann O_2 sowohl das Ni-Atom als auch die Fe-Atome angreifen. Im elektrochemischen Experiment

wurde das Ni durch die Bindung von CN^- geschützt und die Fe-Atome vermutlich reduktiv durch umgebenden Seitenketten stabilisiert. Im kristallographischen Experiment hingegen ist zwar das Ni durch die CN^- -Bindung geschützt, die Fe-Atome können jedoch durch O_2 oxidiert werden, sodass schließlich der Cluster zerstört wird.

3.1.4.5 Einfluss von O_2 auf den B- und D-Cluster

Neben den beiden $[\text{NiFe}_4\text{S}_4\text{OH}_x]$ -Clustern besitzt das CODH-II Dimer zwei B-Cluster und einen D-Cluster, der die beiden Monomere verbrückt. Sowohl der B- als auch der D-Cluster sind $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster, welche von den Proteinresten C48, C51, C56 und C70 bzw. C39, C39' und C47, C47' koordiniert werden. Spektroskopische Untersuchungen des B-Clusters konnten zwei Oxidationszustände, den diamagnetischen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+} \text{B}_{\text{ox}}$ -Zustand und den paramagnetischen $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^+ \text{B}_{\text{red}}$ -Zustand, identifizieren (Seravalli *et al.*, 1997; Fraser und Lindahl, 1999). Bei Potenzialen höher als -530 mV konnte für den D-Cluster bisher nur ein diamagnetischer $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ Zustand identifiziert werden. Es wird jedoch diskutiert, ob der D-Cluster ähnliche Redox Eigenschaften wie der B-Cluster aufweisen könnte (Craft *et al.*, 2002; Lindahl, 2002). Vor diesem Hintergrund könnten der B- und D-Cluster mit dem C-Cluster eine „Elektronenleitung“ zu einem Elektronenakzeptor an der Proteinoberfläche bilden. Analog zum dem in Kapitel 3.1.4.2 beschriebenen Vorgehen wurde die Wirkung von O_2 auf den B- und D-Cluster untersucht. In der Abbildung 3.17 sind der B- bzw. D-Cluster im -600 mV Zustand zu erkennen. Die Cluster sind jeweils zu 100 % besetzt und weisen B-Faktoren von ca. 8 \AA^3 auf. Durch die Aufnahme anomaler Datensätze konnten die Fe- und S-Atome eindeutig identifiziert werden. Nach 24 Stunden Inkubation mit O_2 kann die Position der jeweiligen Fe- und S-Atome im B- bzw. D-Cluster wiederum bestätigt werden. Es fällt allerdings auf, dass sich die B-Faktoren des B-Clusters erhöht haben (22 \AA^3). Der D-Cluster weist nicht nur erhöhte B-Faktoren (25 \AA^3), sondern auch einen niedrigeren Besetzungsgrad der Atome (50 %) auf. Hier muss jedoch beachtet werden, dass die untersuchten Datensätze bei unterschiedlichen Auflösungen aufgenommen wurden (0 min: 1.08 \AA , 24 h: 1.75 \AA), wodurch die jeweilige Besetzung und die B-Faktoren beeinflusst werden.

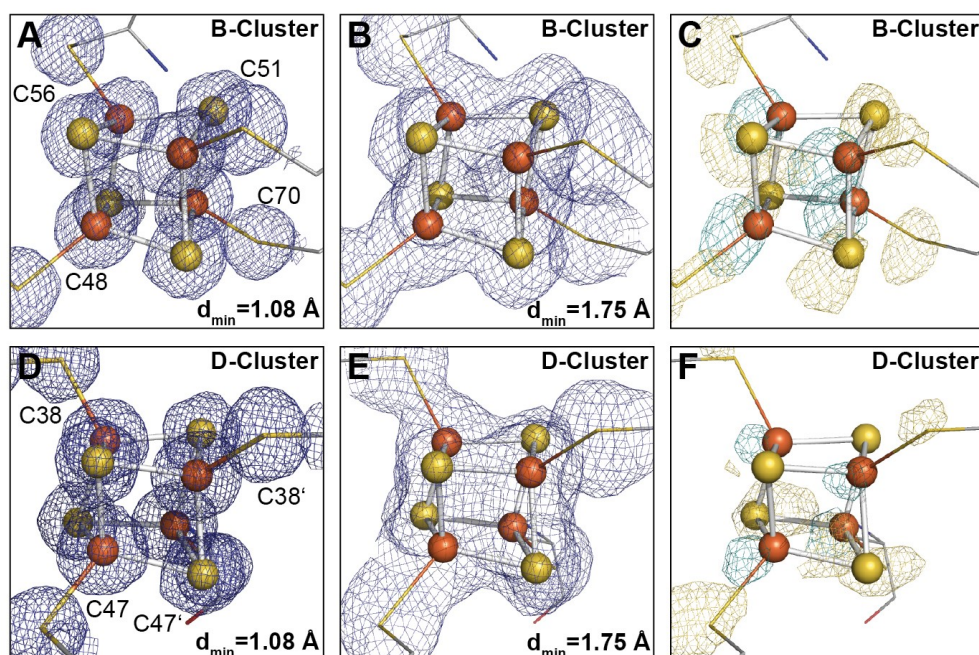


Abbildung 3.17: Einfluss von O₂ auf den B- und D-Cluster der CODH-II_{Ch}. (A) -600 mV Zustand des B-Clusters. (B) B-Cluster nach 24 h Behandlung mit O₂ (C) Anomale Differenz-Fourier-Karten des B-Cluster nach 24 h Behandlung mit O₂. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe (cyan) bei 20.0 σ und für S (gelb) bei 4.5 σ konturiert. (D) -600 mV Zustand des D-Clusters (E) D-Cluster nach 24 h Behandlung mit O₂ (F) Anomale Differenz-Fourier-Karten des D-Cluster nach 24 h Behandlung mit O₂. Die anomalen Differenz-Fourier-Karten wurden für Fe (cyan) bei 11.0 σ und für S (gelb) bei 3.5 σ konturiert. Die 2F_o-F_c Elektronendichtekarten (blau) wurden bei 1.0 σ konturiert. Fe-Atome sind orange und S-Atome gelb dargestellt.

Generell sind [Fe₄S₄]-Cluster eher sauerstoffsensitiv. So wurde z.B. für den [Fe₄S₄]-Cluster der Aconitase ein sauerstoffinduzierter Zerfallprozess beschrieben, welcher die Ausbildung eines [Fe₃S₄]-Intermediats beinhaltet (Flint *et al.*, 1993a). Es konnten aber auch O₂-stabile [Fe₄S₄]-Cluster identifiziert werden, wie z. B. in HiPIPs (Hochkoepler *et al.*, 1995). Trotz zahlreicher Untersuchungen ist unklar, welche spezifischen Mechanismen zur O₂-Sensitivität bzw. O₂-Toleranz der jeweiligen Cluster führen. Werden künstliche Fe,S-Cluster ohne Proteinliganden synthetisiert, kann eine Zersetzung des Clusters durch O₂ festgestellt werden (Ibers und Holm, 1980). Die umgebenden Proteinreste sind also entscheidend für die O₂-Toleranz der Cluster. Substratspezifische Tunnel (Buhrke *et al.*, 2005) und die Ausbildung sperriger, hydrophobe Seitenketten nahe Fe,S-Clustern können vermeiden, dass O₂ diese erreicht und verhindern so die Zerstörung der Cluster (Agarwal *et al.*, 1995; Mulholland *et al.*, 1999; Jarvis *et al.*, 2009). Auch eine erhöhte Stabilität des Proteinrückgrats kann die Sauerstofftoleranz erhöhen, da Umwandlungen von Fe,S-Clustern oft auch mit einer Reorganisation der koordinierenden Proteinreste einhergehen (Jung *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2011). Wie bereits beschrieben verbindet in CODH-II_{Ch} ein

hydrophober Kanal den C-Cluster mit der Proteinoberfläche (Dobbek *et al.*, 2001; Fessler, 2015). Der B-Cluster liegt ca. 15 Å unterhalb der Proteinoberfläche. Er ist nicht Teil des beschriebenen Tunnelsystems und wird daher vor der Zerstörung durch O₂ bewahrt. Auch der D-Cluster ist nicht Teil des Tunnelsystems. Er ist jedoch an der Proteinoberfläche lokalisiert und daher potenziellen Angriffen durch O₂ ausgesetzt. Zwar zeigt der D-Cluster im Vergleich zum B-Cluster eine stärkere Destabilisierung, überraschenderweise wird er jedoch nicht vollständig abgebaut. Vermutlich tragen umgebende Seitenketten zu einer Stabilisierung des D-Clusters bei.

3.2 KOHLENMONOXID-DEHYDROGENASE IV

3.2.1 Heterologe Expression und Reinigung

Ein Expressionssystem für CODH-IV_{Ch} war zu Beginn der Arbeit nicht vorhanden und musste zunächst etabliert werden. Aufgrund der engen phylogenetischen Verwandtschaft zwischen CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} wurde für CODH-IV_{Ch} ein Ansatz ähnelnd dem der CODH-II_{Ch} gewählt. *cooS-IV_{Ch}* konnte in den Vektor pET28a-TEV, welcher eine TEV-Schnittstelle zum Abtrennen des N-terminalen *His-tags* enthält, kloniert werden. CODH-IV_{Ch} wurde anschließend, wie schon zuvor für CODH-II_{Ch} beschrieben (3.1.1), im 1.6 l -Maßstab in Rosetta 2 (DE3) pPRKISC exprimiert. Der Expressionsverlauf wurde überwacht und ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Bei Vergleich des Expressionsmusters vor ($t = 0$ h) und nach Induktion ($t = 22$ h) lässt sich deutlich eine Bande bei ca. 68 kDa erkennen, welche mit dem errechneten Molekulargewicht der CODH-IV_{Ch} (68.3 kDa) übereinstimmt. Pro l Zellkultur konnte ein Nasszellgewicht von ca. 2 g erreicht werden. Nach Zellaufschluss und Zentrifugation befand sich nur ein geringer Teil der CODH-IV_{Ch} im Pellet. Wiederum wurde wie bereits für CODH-II_{Ch} beschrieben verfahren. Mittels des N-terminalen *His-tags* wurde der lösliche Teil der CODH-IV_{Ch} über eine Ni-Sepharose-Säule gereinigt. Abweichend zur Aufreinigung der CODH-II_{Ch} wurde schließlich der N-terminale *His-tag* durch Zugabe einer TEV-Protease entfernt.

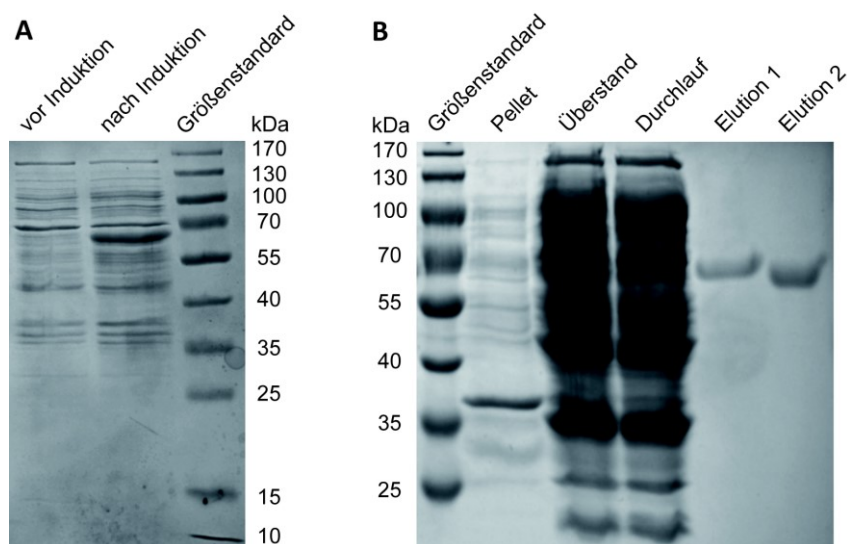


Abbildung 3.18: Heterologe Expression und Reinigung der CODH-IV_{Ch}. Es wurden 12%ige SDS-PAGE-Gel verwendet und jeweils 5 µl Größenstandard aufgetragen. (A) Proteinexpression vor ($t = 0$ h) und nach Induktion ($t = 22$ h). (B) Verlauf der Reinigung von CODH-IV_{Ch}. Es wurden Proben von Pellet, Überstand, Durchlauf, Elution 1 (CODH-IV_{Ch} mit *His-tag*) und Elution 2 (CODH-IV_{Ch} ohne *His-tag*) aufgetragen.

3.2.2 Bestimmung der kinetischen Parameter

In einer vorigen Arbeit wurden bereits erste Untersuchungen bezüglich der kinetischen Eigenschaften der CODH-IV_{Ch} durchgeführt (Goetzl, 2009). Diese wurden nun überprüft und ausgeweitet. Ähnlich zur CODH-II_{Ch} verwendet CODH-IV_{Ch} CO als Substrat und kann Elektronen auf oxidiertes Methylviologen übertragen. Es wurden auch NAD⁺ und NADP⁺ auf ihre Funktionalität als Elektronenakzeptor überprüft. Es konnte jedoch keine Reduktion von NAD⁺ bzw. NADP⁺ durch CODH-IV_{Ch} spektrophotometrisch verfolgt werden.

Die CO-Oxidationsaktivität der CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} wurde bei definierten Temperaturen (T = 25 °C, 30 °C, 40 °C, 49 °C, 59 °C) verglichen. Bei Raumtemperatur hatte CODH-IV_{Ch} eine deutlich geringere Aktivität als CODH-II_{Ch} (CODH-II 198 s⁻¹, CODH-IV: 11 s⁻¹). Bei Anstieg der Temperatur näherte sich die Aktivität der CODH-IV_{Ch} der der CODH-II_{Ch} an (Aktivität bei 59 °C - CODH-II_{Ch}: 1193 s⁻¹, CODH-IV_{Ch}: 669 s⁻¹). Zur Visualisierung der Daten wurde eine Arrhenius-Darstellung gewählt, welche zeigt, dass die Daten dem Arrhenius-Gesetz folgen. Für CODH-II_{Ch} wurde eine Aktivierungsenergie von 40 kJ/mol und für CODH-IV_{Ch} eine Aktivierungsenergie von 100 kJ/mol ermittelt. Die Aktivierungsenergie der CODH-II_{Ch} ist vergleichbar mit derer anderer Ni,Fe-CODHs (Möller-Zinkhan und Thauer, 1990; Kumar *et al.*, 1993) und CuSMo-CODHs (Zhang *et al.*, 2010; Wilcoxon und Hille, 2013), deren Aktivierungsenergien in einem Bereich von 40 - 60 kJ/mol liegen und welche auch dem Arrhenius-Gesetz folgen. (Tab. 3.3). Die Aktivierungsenergie der CODH-IV_{Ch} hingegen ist ca. doppelt so hoch und unterscheidet sich somit klar von der anderer CODHs.

Tabelle 3.3: Aktivierungsparameter von CO-Dehydrogenasen.

	E_a [kJ/mol]	Referenz
CODH-IV _{Ch}	100.0	diese Arbeit
CODH-II _{Ch}	40.0	diese Arbeit
Ni,Fe-CODH _{Af}	49.0	(Möller-Zinkhan und Thauer, 1990)
Ni,Fe-CODH _{Mt}	52.2	(Kumar <i>et al.</i> , 1993)
Cu-CODH	47.8	(Zhang <i>et al.</i> , 2010)
Ag-CODH	42.65	(Wilcoxon und Hille, 2013)

Ergänzend zu den Aktivitätsmessungen in Lösung wurden in Kooperation mit Mériem Merrouch (Universität Marseille) protein-voltammetrische Experimente durchgeführt. In der Proteinfilmvoltammetrie (PFV) werden Redoxenzyme auf einer rotierenden Elektrode immobilisiert, sodass ein direkter und schneller Elektronentransfer gewährleistet werden

kann. Das Substrat (CO) wird in die elektrochemische Zelle injiziert und verursacht eine Änderung der Stromstärke, welche proportional zur enzymatischen Aktivität ist. Nach Injektion von CO in die Zelle, nimmt dessen Konzentration exponentiell ab. Unter Nutzung dieser Kenntnis kann mit nur einer Messung die CO-Oxidationsaktivität bei verschiedenen CO-Konzentrationen bestimmt werden und so eine schnelle Bestimmung des K_m -Werts durchgeführt werden (Leger *et al.*, 2004). Exemplarisch ist in Abbildung 3.19 ein solches Experiment dargestellt. Die Abbildung zeigt ein für CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} typisches CO-Oxidationssignal. Bei 25 °C wurde für CODH-IV ein K_m -Wert von 47 ± 3 nM und für CODH-II ein K_m -Wert von 8 ± 1 μ M ermittelt. Es wurden weitere Bestimmungen des K_m -Werts in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 60 °C durchgeführt. Der K_m -Wert der CODH-IV_{Ch} steigt von 47 nM (25 °C) auf 500 nM (60 °C), wohingegen der K_m -Wert der CODH-II_{Ch} in der gleichen Temperaturspanne bei ca. 10 μ M verbleibt. Der hier elektrochemisch ermittelte K_m -Wert der CODH-II_{Ch} stimmt somit mit dem in Lösung bestimmten K_m -Wert der nativen CODH-II_{Ch} (18 μ M) überein (Svetlitchnyi *et al.*, 2001).

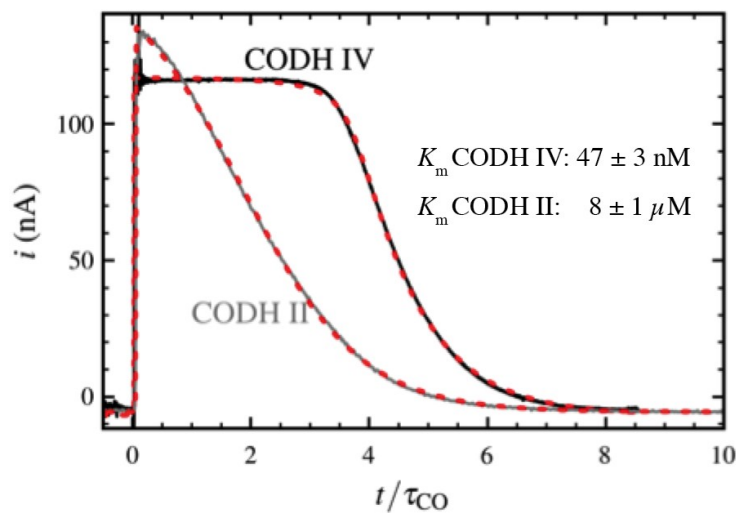


Abbildung 3.19: Elektrochemische Bestimmung des K_m -Werts der CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch}. Die Abbildung zeigt die Stromstärke nach Injektion von 50 μ M CO in die elektrochemische Zelle in Abhängigkeit der Zeit. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen wurde die Zeit unter Berücksichtigung der Zeitkonstante τ_{CO} normalisiert (CODH-IV_{Ch}: $\tau_{CO} = 36.9 \pm 3.0$ s, CODH-II_{Ch}: $\tau_{CO} = 6.27 \pm 0.05$ s). Die gestrichelten Linien stellen die jeweilige nicht-lineare Anpassung an Gleichung 9 aus (Merrouch *et al.*, 2017) dar. Bedingungen: pH = 7.0, T = 25 °C. Verändert nach (Domnik *et al.*, 2017).

In Abbildung 3.20 sind die Ergebnisse der Aktivitätstests in Lösung und der Voltammetrieexperimente kombiniert dargestellt. Auch die katalytische Effizienz beider Enzyme wird in Abhängigkeit der Temperatur verglichen ($k_{eff} = k_{cat}/K_m$), da der Vergleich

der katalytischen Effizienz einen Erklärungsansatz für das unterschiedliche Verhalten der Enzyme liefert. Katalytisch perfekte Enzyme arbeiten so schnell, dass die Diffusion des Substrats zum aktiven Zentrum bzw. die Diffusion des Produkts aus dem aktiven Zentrum die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sind (Alberty und Hammes, 1958). Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ der CODH-IV_{Ch} liegt in einem Temperaturbereich von 25 °C – 60 °C bei $3 \cdot 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, was der Temperaturabhängigkeit des CO-Diffusionskoeffizienten in Wasser entspricht (Wise, 1968). Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ der CODH-IV_{Ch} und der CO-Diffusionskoeffizient in Wasser verhalten sich proportional zueinander. CODH-IV_{Ch} arbeitet somit am Diffusionslimit von CO und dementsprechend wird jegliche Änderung des k_{cat} durch eine Änderung des K_{m} kompensiert. CODH-II_{Ch} hingegen wird innerhalb der getesteten Temperaturspanne nicht durch Diffusion limitiert. Im Vergleich mit anderen Enzymen lässt sich der $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ der CODH-IV_{Ch} einordnen. Das „Durchschnittsenzym“ weist einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ von ca. $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf (Bar-Even *et al.*, 2015). Andere CODHs hingegen weisen weitaus höhere $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Werte auf. CuSMo-CODHs katalysieren die Oxidation von CO zu CO₂, jedoch nicht die entsprechende Rückreaktion. Trotz dieser Priorisierung erreichen sie einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ von nur $8.7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Zhang *et al.*, 2010; Wilcoxon *et al.*, 2011a). Die bifunktionelle CODH aus *M. thermoacetica* erreicht hingegen eine $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ von $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Seravalli *et al.*, 1995). Monofunktionale CODHs weisen den höchsten $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ auf, wie zum Beispiel die CODH aus *R. rubrum* mit $2.5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Staples *et al.*, 1999) und die CODH-II aus *C. hydrogenoformans* mit $1.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 70 °C (Svetlitchnyi *et al.*, 2001). Mit CODH-IV_{Ch} mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ von $3 \cdot 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ist somit ein weiteres katalytisch perfektes Enzym identifiziert worden.

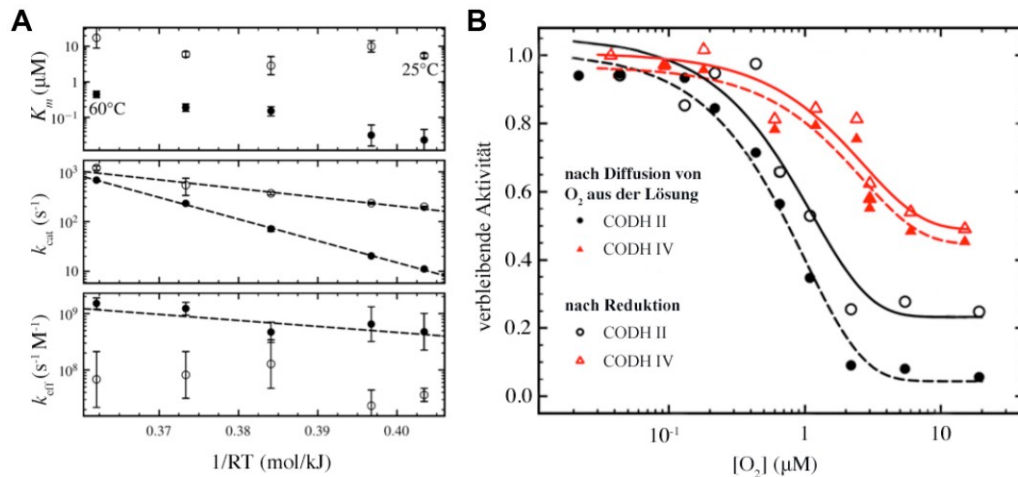


Abbildung 3.20: Kinetische Parameter der CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch}. (A) Abhängigkeit des K_m -Werts (obere Abb.), der Umsatzrate k_{cat} (mittlere Abb.) und der katalytischen Effizienz k_{cat}/K_m (untere Abb.) der CODH-II_{Ch} (ungefüllte Kreise) und CODH-IV_{Ch} (gefüllte Kreise) von der Temperatur. Die gestrichelten Linien in der mittleren Abbildung stellen die mathematische Annäherung an das Arrhenius-Gesetz dar. Die gestrichelte Linie in der unteren Abbildung zeigt die Abhängigkeit des CO-Diffusionskoeffizienten von der Temperatur in Wasser. (B) Aktivität der CODH-II_{Ch} (schwarz) und CODH-IV_{Ch} (rot) nach Diffusion des Sauerstoffs aus der Lösung (gefüllte Symbole) und nach anschließender Reduktion (ungefüllte Symbole). Abbildungen abgewandelt nach (Domnik *et al.*, 2017).

Zum Vergleich der O₂-Sensitivität wurden CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} kurzzeitig verschiedenen O₂-Konzentrationen einer Spanne von 30 nM bis 20 μM ausgesetzt. Ihre verbleibende CO-Oxidationsaktivität wurde direkt nach der Diffusion des Sauerstoffs aus der Reaktionslösung und nach anschließender Reduktion bestimmt. CODH-IV_{Ch} ist O₂-resistenter als CODH-II_{Ch}, lässt sich nach O₂-Behandlung im Gegensatz zur CODH-II_{Ch} jedoch nicht reaktivieren (Abb. 3.20). Im Vergleich mit einer weiteren homologen CODH aus *Desulfovibrio vulgaris* (Merrouch *et al.*, 2015) ist die O₂-Resistenz der CODH-IV_{Ch} jedoch eher schwach ausgeprägt. So lässt sich CODH_{Dv} nach Reduktion wieder vollständig aktivieren. Erst bei hohen O₂-Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) wird das Ausmaß der Reaktivierung eingeschränkt. Vermutlich existieren innerhalb des jeweiligen CODH-Proteingemischs unterschiedliche C-Cluster Spezies. Vor dem Hintergrund der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Zerstörung des C-Clusters in CODH-II_{Ch} könnte so zwischen einem oxidierten C-Cluster und bereits zerstörten C-Cluster unterschieden werden. Wobei nur ersterer durch einen reduktiven Puls wieder reaktiviert werden könnte.

Es wurde die spezifische CO-Oxidationsaktivität der CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} bei definierten pH-Werten (pH = 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) ermittelt und verglichen. Sämtliche Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Im sauren Milieu zeigten sowohl CODH-II_{Ch}

als auch CODH-IV_{Ch} eine schwache Aktivität (pH 5.5 - CODH-II_{Ch}: 84 s⁻¹, CODH-IV_{Ch}: 3 s⁻¹). Beim Wechsel zu alkalischen Bedingungen stieg die Aktivität beider Enzyme kontinuierlich an, wobei CODH-IV_{Ch} eine stärkere Aktivierung aufwies (pH 9.0 - CODH-II_{Ch}: 1821 s⁻¹, CODH-IV_{Ch}: 116 s⁻¹) (Abb. 3.21). Diese Resultate stimmen mit früheren Ergebnissen aus *R. rubrum* (Bonam *et al.*, 1984) und *M. thermoacetica* (Seravalli *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2004) überein. Sie widersprechen jedoch den Ergebnissen von Svetlichnyi *et al.* (Svetlitchnyi *et al.*, 2001) und Jeoung (Jeoung, 2008), welche eine Optimumskurve mit höchster Aktivität bei pH 8 für native bzw. rekombinante CODH-II aus *C. hydrogenoformans* bestimmt haben.

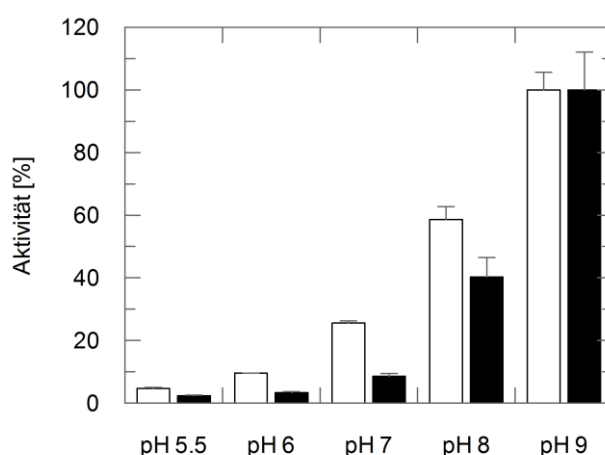


Abbildung 3.21: pH-abhängige CO-Oxidationsaktivität von CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch}. Messungen der Aktivität von CODH-II_{Ch} (weiß) und CODH-IV_{Ch} (schwarz) wurden bei 25 °C bei pH = 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 durchgeführt. Die jeweilige Aktivität der Enzyme bei pH 9 wurde als 100% festgelegt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Tatsächlich ist eine Erhöhung der Aktivität unter Berücksichtigung des postulierten Reaktionsmechanismus der CODH-II_{Ch} (Jeoung und Dobbek, 2007) bei steigenden pH-Werten ein wahrscheinliches Szenario. Zunächst bindet Wasser zwischen Fe₁ und Ni. Ein Proton dieses Wassers wird über konservierte Histidine (H93, H96, H99, H102) (Kim *et al.*, 2004) abtransportiert, was nur möglich ist, wenn die Histidine in deprotonierter Form vorliegen. Die Berechnung der pK_a-Werte (Tan *et al.*, 2013) ergab, dass die Histidine nahe des C-Clusters (H93, H96) schon bei niedrigen pH-Werten (~ pH 5) in deprotonierter Form vorliegen. Bei steigenden pH-Werten (~pH 7) liegen dann auch die weiter entfernten Histidine (H99, H102) in deprotonierter Form vor. Entscheidend für die Stabilisierung des Ni-CO(OH) Intermediats ist außerdem der Lysin-Rest K563. Den Berechnungen nach liegt dieser zwar bei den gemessenen pH-Werten in protonierter Form vor. Ciaccafava *et al.*

vermuteten jedoch in einer kürzlich veröffentlichten Studie, dass der Lysin-Rest K563 sein Proton auf den in der Nähe befindlichen Hydroxyliganden überträgt, sodass K563 in seiner deprotonierten Form vorliegt (Ciaccafava *et al.*, 2016).

3.2.3 Kristallisation der CODH-IV

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits Protokolle zur Kristallisation der CODH-IV_{Ch}, es sollte aber ein unabhängiges Verfahren entwickelt werden. Zunächst wurde versucht CODH-IV_{Ch} ohne voriges Abtrennen des *His-tags* zu kristallisieren. Dafür wurden kommerziell erhältliche *Kristallisationsscreens* verwendet und ein *sitting drop* Verfahren gewählt. Zwar entwickelten sich innerhalb eines Monats Kristalle, jedoch konnte mit diesen nur eine maximale Auflösung von bis zu 3 Å erreicht werden. Die Reproduktion einer ausgewählten Bedingung (0.1 M HEPES (pH 6.0), 50 % (v/v) Propylenglykol 400, 5 % (v/v) DMSO) nach dem *hanging drop* bzw. *sitting drop* Verfahren führte weder zu einer Vergrößerung der Kristalle noch zu einer Verbesserung der Diffraktion. Daher wurde ein Strategiewechsel vollzogen und der *His-tag* vor der Kristallisation abgetrennt. Nach einem Jahr ließen sich in verschiedenen Bedingungen einiger der verwendeten *Kristallisationsscreens* Kristalle erkennen (MIDAS, PACT, PEG/ION, Proplex). Kristalle der Bedingung MIDAS B11 (20 % (v/v) Polypropylenglykol 400, 10 % (v/v) 1-Propanol) streuten bis zu einer maximalen Auflösung von 2.54 Å (Abb. 3.22).

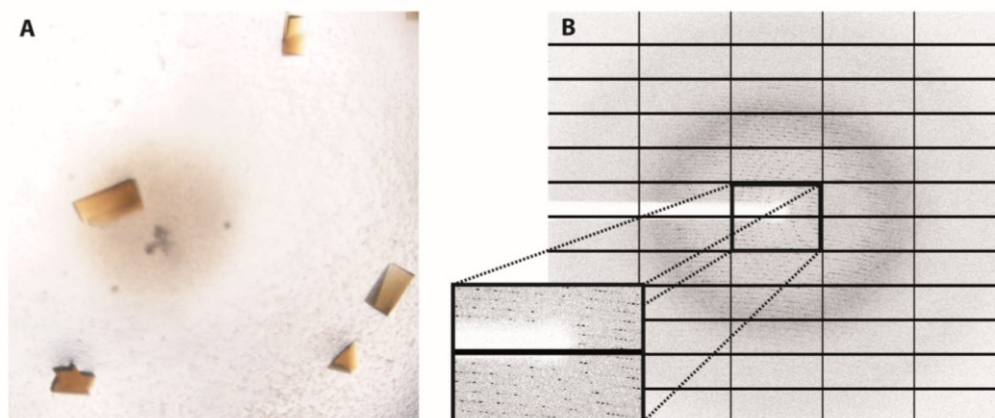


Abbildung 3.22: CODH-IV_{Ch} Kristalle und Röntgendiffraktionsmuster. (A) CODH-IV_{Ch} Kristalle (20 % (v/v) Polypropylenglykol 400, 10 % (v/v) 1-Propanol). (B) Diffraktionsmuster eines CODH-IV_{Ch} Kristalls bei 2.54 Å.

3.2.4 Struktur der CODH-IV

Es wurde ein Datensatz der CODH-IV_{Ch} im *as isolated* Zustand mit einer Auflösung von 2.54 Å bei einer Wellenlänge von 0.91841 Å aufgenommen. Hierbei konnte die Raumgruppe *P*321 mit den Zellkonstanten $a = b = 209 \text{ Å}$, $c = 93 \text{ Å}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ identifiziert werden. Im Anschluss wurde die Struktur der CODH-IV_{Ch} durch Patterson-Suchmethoden gelöst, dabei diente die Struktur der CODH-II_{Ch} im -600 mV Zustand als homologes Suchmodell (Sequenzidentität: 54 %) Unter der Annahme, dass sich 3 Kopien in der asymmetrischen Einheit befinden, konnte ein Matthewscoeffizient (Matthews, 1968) von 2.76 und ein Solvensgehalt von 55.4 % berechnet werden. Der redundanzunabhängige R-Faktor (R_{meas}) evaluiert die Präzision der einzelnen Intensitätsmessungen unabhängig von deren Multiplizität (Diederichs und Karplus, 1997). Ein Grund für den erhöhten R_{meas} des Datensatzes ($R_{\text{meas}} = 22.2 \%$) kann aus Abb. 3.22, in welcher ein Röntgendiffraktionsmuster dargestellt wird, abgeleitet werden. In der Vergrößerung ist zu erkennen, dass vor allem Reflexe niedriger Auflösungsschalen nicht eindeutig definiert sind und somit zu einer Erhöhung des R_{meas} beitragen. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Qualitätsindikator, der R_{pim} , welcher die Präzision der gemittelten Messung beschreibt, hinzugezogen. Der R_{pim} des Datensatzes beträgt 5.8 %. Dieser Qualitätsindikator sollte eine größere Aussagekraft besitzen, da bei Strukturbestimmung und -verfeinerung auch gemittelte Intensitäten und Amplituden verwendet werden. (Weiss, 2001). Bei Betrachtung des Strukturmodells nach Phasierung konnte außerdem keine übermäßige Beeinflussung durch das verwendete Suchmodell festgestellt werden. Sperrige Seitenketten, die in CODH-II_{Ch} nicht vorhanden sind, lassen sich klar durch Elektronendichten identifizieren (Anhang, Abb. A.4). Die Struktur wurde durch zyklischen Modellbau und Verfeinerung ermittelt, wobei die Reste 4-633 durch Elektronendichte definiert werden konnten. In der asymmetrischen Einheit lassen sich ein kovalent verbundenes Homodimer und ein symmetrieverwandtes Monomer finden. Bei genauerer Betrachtung der B-Faktoren lässt sich eine größere Flexibilität des Monomers erkennen. Dies könnte die Ursache der Erhöhung des R_{meas} darstellen, da durch die Flexibilität des Monomers einzelne Reflexe nicht mehr eindeutig definiert werden können. Innerhalb eines jeden Monomers kann zwischen drei Domänen unterschieden werden, welche im Folgenden als N-terminale Domäne (Proteinreste 4-237), mittlere Domäne (Proteinreste 238-406) und C-terminale Domäne (Proteinreste 407-633) bezeichnet werden. Abbildung 3.23 bietet eine Übersicht über die Gesamtstruktur der CODH-IV_{Ch}.

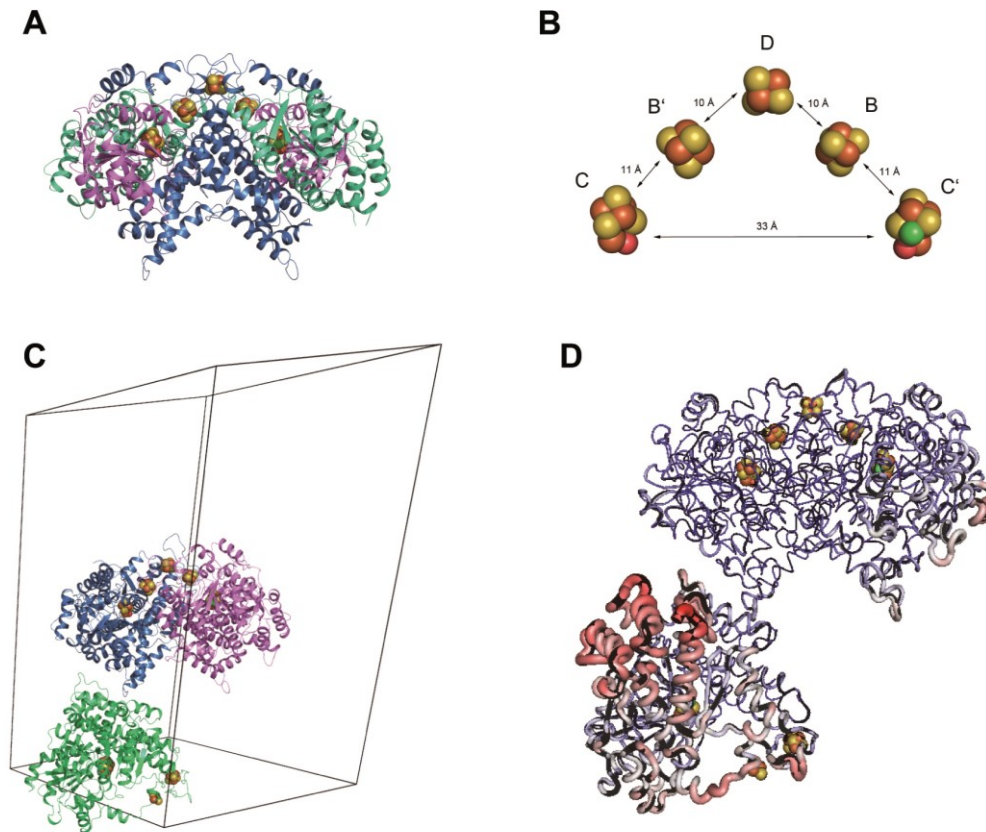


Abbildung 3.23: Gesamtstruktur der CODH-IV_{Ch}. (A) Bändermodell der Gesamtstruktur. Die verschiedenen Domänen der CODH-IV_{Ch} sind farblich gekennzeichnet (N-terminale Domäne: blau, mittlere Domäne: violett, C-terminale Domäne: grün). Metallcluster sind als Sphären dargestellt. (B) Metallzentren der CODH-IV_{Ch} (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb). Distanzen sind in Ångström angegeben. (C) Lage der CODH-IV_{Ch} in der Einheitszelle. (D) Visualisierung der B-Faktoren. Der Farbverlauf von blau nach rot (20 - 80 Å²) korreliert mit steigenden B-Faktoren.

Das CODH-IV_{Ch} Dimer besitzt fünf Metallzentren, drei [Fe₄S₄] Cluster und zwei [NiFe₄S₄OH_x] Cluster. Der [Fe₄S₄] D-Cluster verbindet die beiden Monomere und wird durch die Proteinreste C38, C46 und C38', C46' koordiniert. Die beiden [Fe₄S₄] B-Cluster werden durch die Proteinreste C47, C50, C55 und C69 koordiniert. Die jeweiligen aktiven Zentren bilden die zwei [NiFe₄S₄OH_x] C-Cluster. Der [Fe₃S₄] Kern des Clusters wird durch die Reste C333, C446, C476, das *exo*-Fe durch die Reste C295, H261, und Ni durch C525 koordiniert (Abb. 3.24).

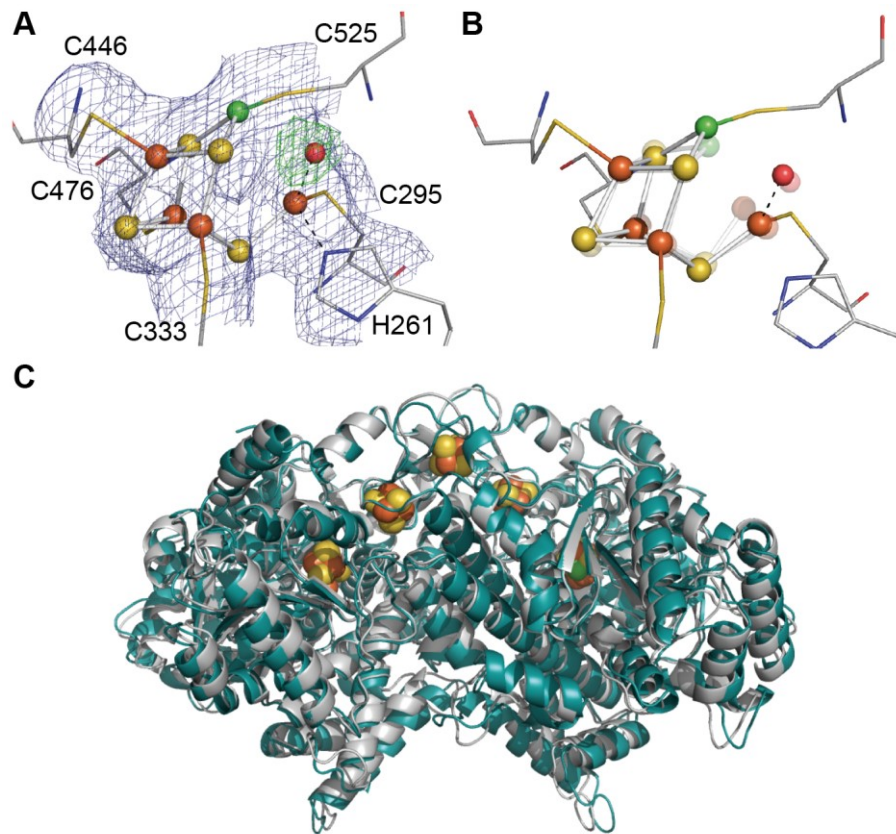


Abbildung 3.24: (A) Darstellung des aktiven Zentrums der CODH-IV_{Ch} (C-Cluster) und relevanter koordinierender Proteinreste im *as isolated* Zustand (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb, O: rot). Die 2F_o-F_c Karte (blau) des Clusters wurde bei 1 σ konturiert. Die zugehörige F_o-F_c Karte (grün) wurde bei 3.5 σ konturiert. (B) Vergleich des C-Clusters der CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} (transparent dargestellt, pdb-ID: 3B51) (Jeoung und Dobbek, 2007). (C) Überlagerung des CODH-IV_{Ch} Dimers (grün) und des CODH-II_{Ch} Dimers (grau).

Die Strukturen der CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} lassen sich mit einem rmsd-Wert von 1.1 Å überlagern. Koordinierende Proteinreste sind in CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} konserviert. Konserviert sind auch die Histidin-Reste 92 und 95 (H93 und H96 in CODH-II_{Ch}) der putativen Protonentransferkette (Kim *et al.*, 2004). H99 und H102 wurden in CODH-IV_{Ch} durch D98 und E101 ausgetauscht, welche ebenfalls als Basen in einem Protonentransfernetzwerk dienen könnten. Auffällig ist jedoch die Ausprägung der Gaskanäle innerhalb von CODH-IV_{Ch}. Die Proteinreste F312, Q559, M198, C333 und H560 liegen in Van-der-Waals-Kontakt zum C-Cluster und schirmen somit möglicherweise S₄ und Fe₂ von Außeneinflüssen ab. In CODH-II_{Ch} hingegen wurde F312 durch S312 und Q559 durch M560 ersetzt. Durch diesen Austausch von Proteinresten wird Raum zwischen Proteinresten und C-Cluster frei, sodass zusätzliche Wasser (W1025, W1032, W1121) in dem frei gewordenen Raum Platz finden (Abb. 3.25). Im Vergleich zu der ansonsten stark

konservierten Umgebung des C-Clusters stellt diese weniger dichte Packung eine Besonderheit dar.

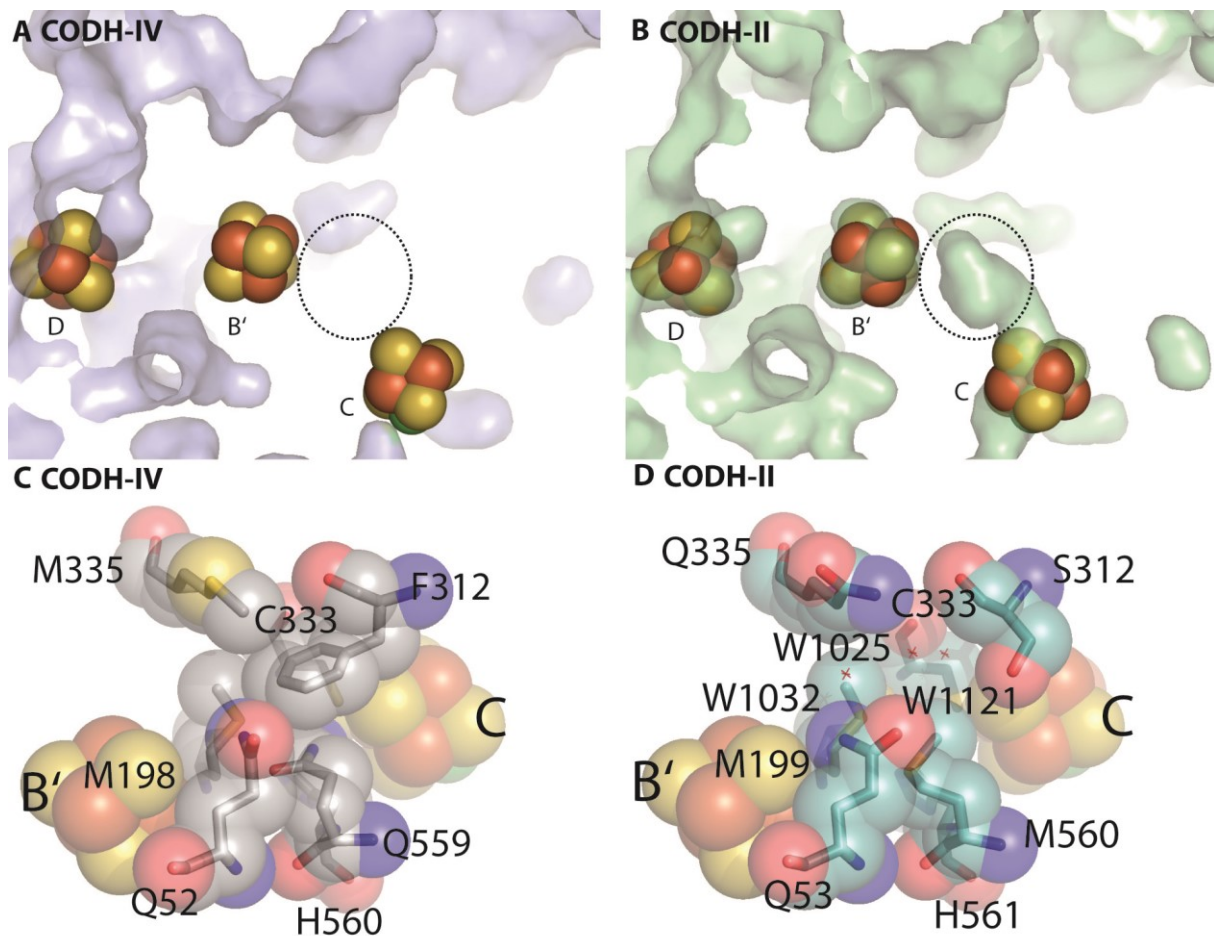


Abbildung 3.25: Vergleich der Gaskanäle und C-Cluster umgebender Proteinreste in CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch}. CODH-II_{Ch} (A) weist eine Kavität an der Rückseite des C-Clusters auf, welche in CODH-IV_{Ch} (B) nicht vorhanden ist. In den Feldern C und D sind die vdW-Radien der Proteinreste nahe F312 (CODH-IV_{Ch}) bzw. S312 (CODH-II_{Ch}) dargestellt. CODH-IV_{Ch} zeigt eine dichtere Packung der Proteinreste nahe des C-Clusters, durch welche eine Ansammlung von Wassermolekülen an der Rückseite des C-Clusters verhindert wird.

Gaskanäle spielen auch in anderen Metalloenzymen eine wichtige Rolle. In O₂-toleranten Ni,Fe-Hydrogenasen wurden hydrophobe Kavitäten gefunden (Montet *et al.*, 1997; Volbeda, 2002, 2002), welche wahrscheinlich deren O₂-Resistenz begründen. (Buhrke *et al.*, 2005). O₂-sensitive Fe-Hydrogenasen bilden Gaskanäle aus (Nicolet *et al.*, 1999), deren Aufbau durch MD-Kalkulationen modelliert werden konnte (Cohen *et al.*, 2005). Für die bifunktionelle CODH/ACS_{Mt} konnte ein Gastunnel einer Länge von 138 Å durch den Heterotetramer modelliert werden (Doukov *et al.*, 2002). In CODH-II aus *C. hydrogenoformans* wurde ein Gaskanal identifiziert, der die aktiven Zentren verbindet

und in welchem n-Butylisocyanid und Xenon-Atome identifiziert werden konnten (Dobbek *et al.*, 2001; Jeoung und Dobbek, 2012). Die in CODH-IV_{Ch} identifizierten Gaskanäle ähneln denen der CODH-II_{Ch} in Durchmesser und Ausprägung. Aufgrund ähnlicher Radien der O₂- und CO/CO₂-Moleküle kann in CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} der Einlass dieser Moleküle ins Enzym nicht unabhängig voneinander koordiniert werden. Berechnungen der Gesamtoberfläche (CODH-IV_{Ch}: 39361 Å², CODH-II_{Ch}: 38557 Å²) und der solvenszugänglichen Oberfläche der beiden Dimere (CODH-IV_{Ch}: 11570 Å², CODH-II_{Ch}: 11323 Å²) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Enzymen. 29.4 % der Gesamtoberfläche sind jeweils zugänglich für Solvensmoleküle (r = 1.4 Å). Der veränderten Packung nahe des C-Clusters muss deswegen besondere Bedeutung zugesprochen werden. Sie könnte ausschlaggebend für die erhöhte O₂-Resistenz der CODH-IV_{Ch} sein.

Eine Funktion geladener Gruppen an der Oberfläche von Proteinen ist die Bildung von Protein-Protein Interaktionen (Gitlin *et al.*, 2006). Durch Berechnung der Oberflächenladung der CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch} ließen sich Unterschiede zwischen den beiden Enzymen bezüglich ihrer Oberflächenladung feststellen. CODH-IV_{Ch} zeigt eine stärkere Ausprägung positiver Ladung auf der Oberseite und negativer Ladung auf der Unterseite als CODH-II_{Ch}. Dementsprechend könnte dies auf unterschiedliche Interaktionspartner der beiden Enzyme hinweisen.

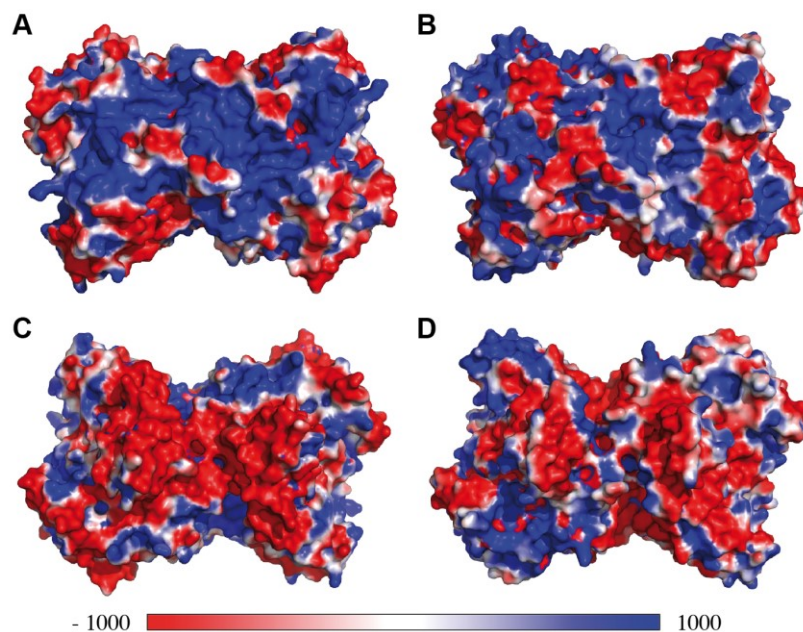


Abbildung 3.26: Vergleich der Oberflächenladung der CODH-IV_{Ch} und CODH-II_{Ch}. (A) CODH-IV_{Ch} Oberseite, (B) CODH-II_{Ch} Oberseite, (C) CODH-IV_{Ch} Unterseite, (D) CODH-II_{Ch} Unterseite.

Über die physiologische Rolle von CODH-IV_{Ch} kann mit jetzigem Wissensstand nur spekuliert werden. Es ist anzunehmen, dass CODH-IV_{Ch} an der oxidativen Stressantwort von *C. hydrogenoformans* beteiligt ist. Das Gencluster, in welchem sich CODH-IV_{Ch} befindet, enthält ein *cooF* Gen und Gene die für ein Rubrerythrin (rbr) und eine FAD enthaltende Oxidoreduktase (NitR) kodieren (Wu *et al.*, 2005). Durch densitometrische Analysen konnte gezeigt werden, dass CODH und CooF in *C. hydrogenoformans* als Komplex in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 vorliegen (Soboh *et al.*, 2002). NitR besitzt NADPH-Oxidase-Aktivität und Rubrerythrin eine Peroxidaseaktivität (Fessler, 2011). Elektronen könnten von CODH-IV_{Ch} über das Ferredoxin CooF2 und NitR auf Rubrerythrin übertragen werden, um H₂O₂ zu H₂O zu reduzieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Annahme, dass CODH-IV_{Ch} an der oxidativen Stressantwort von *C. hydrogenoformans* beteiligt sein könnte. Es konnte gezeigt werden, dass CODH-IV_{Ch} im Vergleich zur CODH-II_{Ch} eine höhere Affinität für CO besitzt und über eine weite Temperaturspanne am Diffusionslimit arbeitet. Durch die veränderte strukturelle Packung am C-Cluster kann CODH-IV_{Ch} möglicherweise kurzfristig auftretenden O₂-Strömen widerstehen. Diese Anpassungen scheinen nicht zufällig zu sein, sondern das Ergebnis hohen selektiven Drucks. Das Bakterium *C. hydrogenoformans*, welches erstmalig aus heißen Quellen der vulkanischen Insel Kunaschir (Russland) isoliert wurde (Svetlichny *et al.*, 1991), könnte CODH-IV_{Ch} unter kälteren CO-ärmeren Bedingungen, wie z.B. in der Sauerstoffreicheren oberen Schicht heißer Quellen benötigen, um Elektronen für die Detoxifizierung von Sauerstoff oder reaktiven Sauerstoffspezies bereitzustellen.

4 SCHLUSSFOLGERUNG

Diese Arbeit befasst sich mit der Untersuchung struktureller und kinetischer Eigenschaften von CODH-II und CODH-IV aus *C. hydrogenoformans*. Dazu wurden zunächst Seitenketten der 1. und 2. Koordinationssphäre der CODH-II_{Ch} ausgetauscht und die Auswirkungen des jeweiligen Austauschs strukturell und kinetisch verfolgt. Zwar konnten in vorigen Studien bereits diverse Seitenketten identifiziert werden, die für die CO-Oxidation relevant sind, die genaue Bedeutung dieser blieb jedoch unklar, da eine strukturelle Untersuchung der Enzymvarianten fehlte (Spangler *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2013).

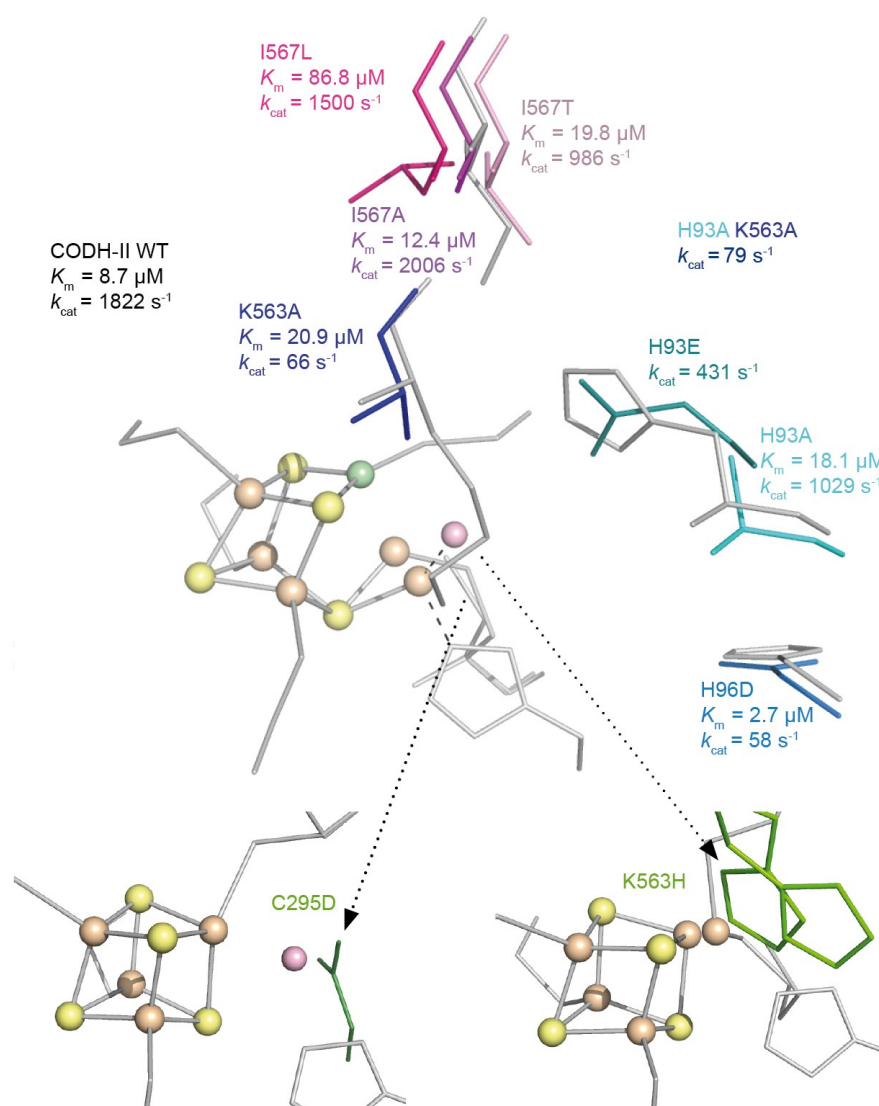


Abbildung 4. 1: Darstellung des C-Clusters (Ni: grün, Fe: orange, S: gelb, O: rosa) der CODH-II_{Ch} und relevanter Seitenketten. In dieser Arbeit ausgetauschte Seitenketten wurden farbig gekennzeichnet und mit den entsprechenden K_m - und k_{cat} -Werten versehen. Seitenketten, deren Austausch zur Bildung eines [Fe₄S₄]-Clusters führten sind grün gekennzeichnet.

In dieser Arbeit wurde daher die kinetische Untersuchung der Enzymvarianten mit einer Strukturanalyse kombiniert. Durch diese Vorgehensweise konnten die durch Austausch induzierten strukturelle Veränderungen, die zu einer Beeinträchtigung bzw. Verbesserung der Aktivität führen können, identifiziert werden. Zudem konnte durch die Ermittlung der Strukturen der jeweilige Ni-Besetzungsgrad, welcher die CO-Oxidationsaktivität der jeweiligen Proteinpräparation bedingt, ermittelt werden. Eine Normierung der Aktivität anhand des Ni-Besetzungsgrads erlaubt daher einen direkten Vergleich der Aktivität der Enzymvarianten.

Für H93 und K563 konnte eine Rolle in der Stabilisierung des Ni-gebundenen Carboxylatkomplexes ausgemacht werden. Zusammen mit H96 könnten diese Seitenketten außerdem an einem Protonentransfernetzwerk beteiligt sein, wobei K563 und H96 eine höhere Bedeutung zukommen könnte. Der Isoleucin-Rest I567 ist am Beginn eines Gaskanals der CODH-II_{Ch} lokalisiert. Kung und Drennan vermuteten, dass I567 das Ni-gebundene CO in die katalytisch günstigste Orientierung zwingen könnte (Kung und Drennan, 2011). Die hier erhaltenen Ergebnisse (insbesondere die Untersuchung der I567A-Variante) deuten jedoch eher darauf hin, dass I567 zur Stabilisierung des Nickels im C-Cluster beiträgt. Durch den Austausch der Seitenketten C295 durch Aspartat bzw. den Austausch der Seitenkette K563 durch Histidin, konnte ein [Fe₄S₄]-Cluster erzeugt werden. Vermutlich ist die Koordination des Fe₁ entscheidend für die Entstehung des [NiFe₄S₄]-Clusters der CODH-II_{Ch}, da Fe₁ das Nickel aus seiner Position verdrängt, wenn es nicht stabilisiert wird. In Abbildung 4.1 sind die verschiedenen Enzymvarianten der CODH-II_{Ch} zusammen mit ihren jeweiligen K_m - und k_{cat} -Werten dargestellt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Wirkung von O₂ auf CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} untersucht. Um einen genaueren Einblick in die Wirkungsweise des O₂ auf Ni,Fe-CODHs erhalten zu können, wurde exemplarisch der Einfluss von O₂ auf CODH-II_{Ch} in Lösung und *in crystallo* über einen Zeitraum von 24 h verfolgt. Inkubation mit O₂ führte zum Verlust der CO-Oxidationsaktivität und zur Zerstörung des C-Clusters der CODH-II_{Ch}. Interessanterweise wurden der B- und D-Cluster nicht durch O₂ geschädigt. Der Zerfall des C-Clusters ist gekennzeichnet von drei zentralen Charakteristika: Der Ausbildung eines [NiFe₄S₄-S]-Intermediats, dem Austausch des Ni durch Fe und dem Abbau der S-Atome. Die Ausbildung des [NiFe₄S₄-S]-Intermediats wird begleitet von einer Positionsänderung des Fe₄ und könnte den Cluster temporär vor oxidativer Schädigung schützen. Dabei zeigten Studien mit CN⁻ gebundener CODH-II_{Ch}, dass O₂ nicht primär das Nickel attackiert.

Vermutlich werden auch die Fe-Atome durch O₂ angegriffen. Die oxidative Behandlung von CODH-II_{Ch} Kristallen erlaubte die Identifikation eines putativen C_{ox}-Zustands, welcher durch die Ausbildung einer weiteren Position des Fe₄ charakterisiert wird. Abbildung 4.3 stellt schematisch den zeitlichen Verlauf der Zerstörung durch O₂ dar.

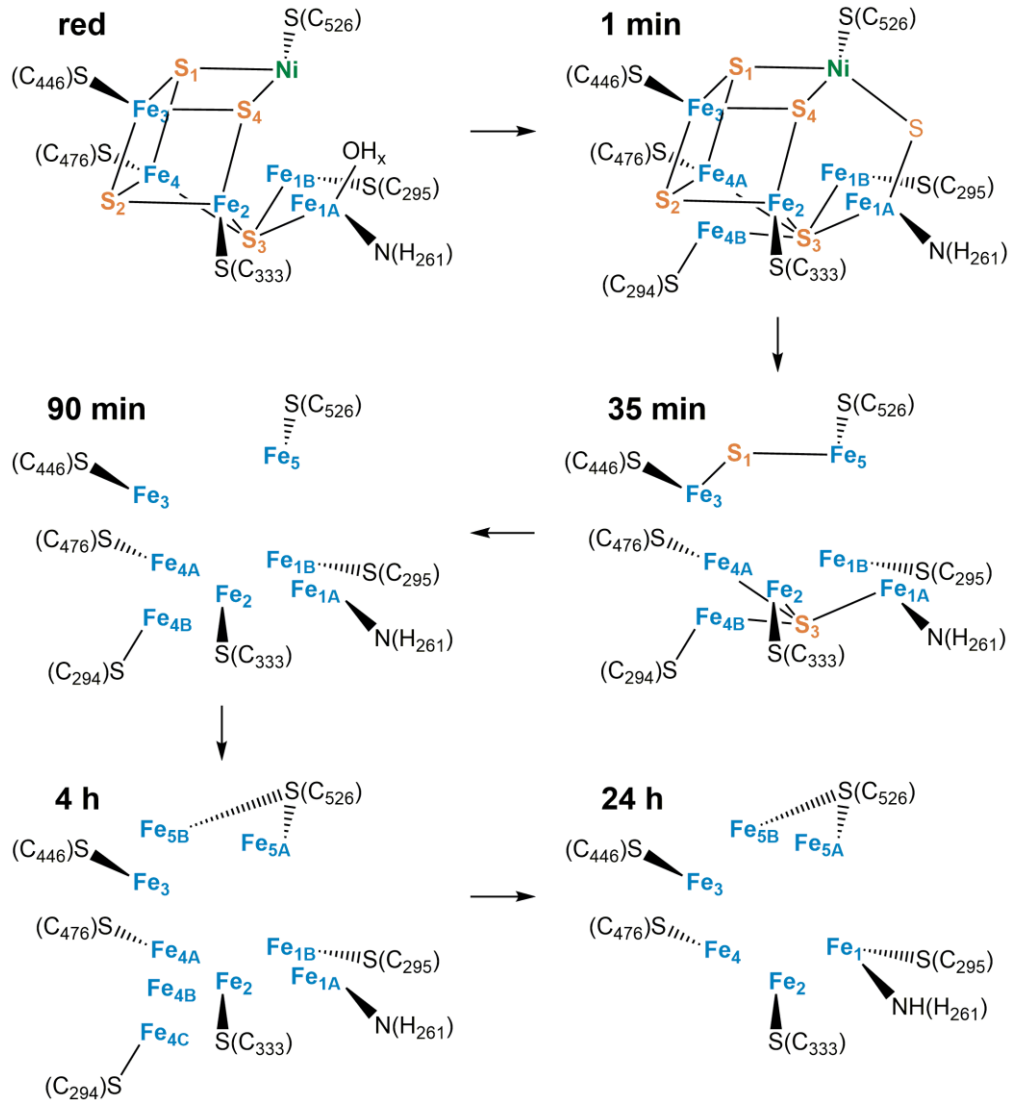


Abbildung 4.2: schematische Darstellung der Zerstörung des C-Clusters der CODH-II_{Ch} durch O₂ ausgehend vom -600 mV Zustand (red) über einen Zeitraum von 24 h.

Für CODH-IV_{Ch} wird eine Rolle in der oxidativen Stressantwort von *C. hydrogenoformans* diskutiert (Wu *et al.*, 2005). Um die Bedeutung der CODH-IV_{Ch} zu untersuchen wurden die kinetischen Parameter und die Struktur des Enzyms analysiert und mit CODH-II_{Ch} verglichen. Mit CODH-IV_{Ch} konnte ein katalytisch perfektes Enzym identifiziert werden, welches die CO-Oxidation in einem Temperaturbereich von 25 °C bis 60 °C mit einer katalytischen Effizienz von $3 \cdot 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ katalysiert. CODH-IV_{Ch} arbeitet somit am CO-

Diffusionslimit. Zwar hat CODH-IV_{Ch} bei Raumtemperatur eine niedrigere CO-Oxidationsaktivität als CODH-II_{Ch}, lässt sich aber stärker aktivieren als CODH-II_{Ch} und erreicht bei 60 °C nahezu deren Aktivität. CODH-IV zeigt bei 25 °C für CO einen K_m von 47 nM, welcher ca. um den Faktor 10^3 niedriger ist als der der CODH-II_{Ch} (Abb. 4.2).

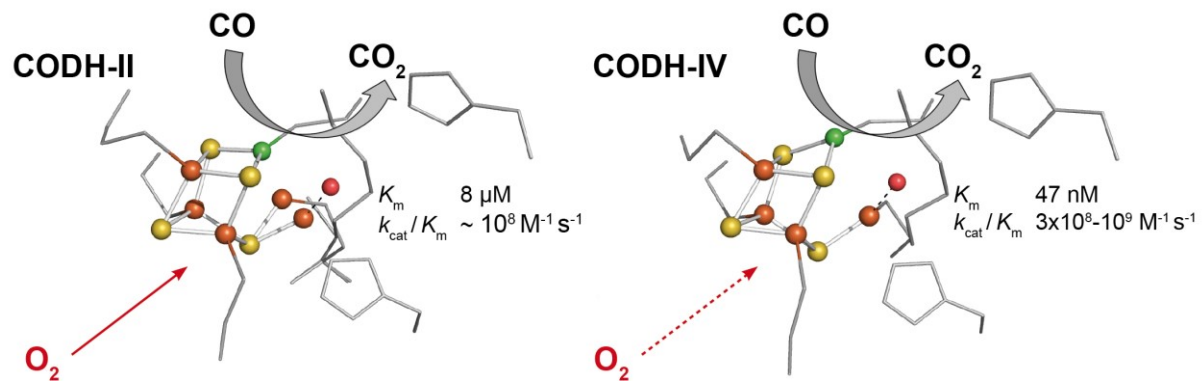


Abbildung 4.3: Vergleich des C-Clusters der CODH-II_{Ch} mit dem C-Cluster der CODH-IV_{Ch}.

CODH-IV_{Ch} kann transienten O₂-Strömen besser widerstehen als CODH-II_{Ch}. Strukturell unterscheiden sich CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} jedoch kaum. Beide Enzyme sind Heterodimere, welche einen verbrückenden [Fe₄S₄] D-Cluster zwei [Fe₄S₄] B-Cluster und zwei [NiFe₄S₄OH_x] C-Cluster zeigen. Ein struktureller Unterschied konnte an der Rückseite des C-Clusters ausgemacht werden. So sind die Proteinreste S312 und M560 der CODH-II_{Ch} in CODH-IV_{Ch} durch ein Phenylalanin- und einen Glutamin-Rest ausgetauscht. Die O₂-Toleranz der CODH-IV könnte demnach durch diese Protein-Reste bedingt sein, welche den C-Cluster vor Angriffen durch O₂ schützen könnten. Die hier ermittelte erhöhte O₂-Toleranz der CODH-IV_{Ch} spricht dafür, dass CODH-IV_{Ch} *in vivo* an der oxidativen Stressantwort in *C. hydrogenoformans* beteiligt sein könnte.

5 AUSBLICK

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten das Verständnis des katalytischen Prozesses in CODH-II_{Ch} signifikant erweitern. Erstmals wurde die kinetische Untersuchung von Enzymvarianten einer CODH mit einer strukturellen Analyse gekoppelt. Dabei konnte die Identität der Seitenketten H93, K563 und H96 als Teil eines Protonentransfernetzwerkes bestätigt werden. Weitere Studien sind nötig, um alle beteiligten Seitenketten des Protonentransfernetzwerkes in CODH-II_{Ch} zu identifizieren. Durch den Austausch eines Protein-Rests konnte außerdem der [NiFe₄S₄]-Cluster in einen [Fe₄S₄]-Cluster, welcher keinerlei CO-Oxidationsaktivität mehr aufwies, transformiert werden. Fraglich ist, ob dieser Cluster nun auch die Reduktion von CO₂ nicht mehr katalysieren kann. So katalysiert der [Fe₄S₄]-Cluster des Nitrogenase Fe-Proteins neben der Oxidation von CO auch die Reduktion von CO₂ (Rebelein *et al.*, 2017). Auch andere mögliche Substrate sollten untersucht werden, wie z.B. Hydroxylamin, welches durch den transformierten [Fe₄S₄] C-Cluster der CODH_{Rr} reduziert werden kann (Spangler *et al.*, 1998; Heo *et al.*, 2002). Die Untersuchung des [Fe₄S₄]-Clusters mittels ESR Spektroskopie könnte Aufschluss über den elektronischen Zustand des Clusters geben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Verhalten von CODH-II_{Ch} und CODH-IV_{Ch} gegenüber O₂ untersucht. In CODH-II_{Ch} konnte kristallographisch die Zerstörung des C-Clusters durch O₂ nachvollzogen werden. Dabei konnte eine Sulfid-gebundene Form des Clusters identifiziert werden, welches diesen vor O₂-induzierter Beschädigung schützen könnte. Die Identifikation von Schwefel ist bei der gewählten Versuchsanordnung schwierig. Die Schwefel-Atome des C-Clusters sollten daher gegen Selen ausgetauscht werden, da Selen durch anomale Diffraktionsexperimente besser identifiziert werden kann. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Austausch die Eigenschaften des Clusters verändert. So bewirkte der Austausch von Schwefel durch Selen im [Fe₄S₄]-Cluster des Nitrogenase Fe-Proteins eine Verringerung der Enzymaktivität (Hallenbeck *et al.*, 2009). Zusätzlich dazu konnte durch den Austausch von S durch Se im [Fe₄S₄]-Cluster eines Ferredoxins eine erhöhte O₂-Sensitivität und Instabilität des Clusters bei alkalischen und sauren pH-Werten festgestellt werden (Moulis und Meyer, 2002). Im [Fe₄S₄] H-Cluster der Fe,Fe-Hydrogenase HYDA1 aus *Clamydomonas reinhardtii* hingegen konnten die Schwefel-Atome gegen Selen-Atome ausgetauscht werden, ohne dass dies mit einem signifikanten Verlust der Aktivität einherging (Noth *et al.*, 2016). Um zu testen, ob die Sulfid-gebundene Form des Clusters besser Schäden durch O₂ widerstehen kann, sollte CODH-II_{Ch} analog zu dem in dieser Arbeit angewandten Verfahren in Lösung und *in*

crystallo zunächst mit Schwefel inkubiert und dann mit O₂ behandelt werden. Durch oxidative Behandlung von CODH-II Kristallen mit Thionin wurde zudem ein putativer C_{ox}-Zustand identifiziert, welcher durch eine Destabilisierung des Fe₄ gekennzeichnet ist. Bei dem hier identifizierten Zustand handelt es sich jedoch wahrscheinlich um eine Mischform verschiedener Zustände. Um den reinen C_{ox}-Zustand zu erreichen, sollte zunächst ein schwächeres Reduktionsmittel wie z.B. DTT zu Erzeugung eines C_{red}-Zustands verwendet werden. Durch Optimierung der Inkubationszeit mit dem Oxidationsmittel Thionin und Zugabe eines Elektronenakzeptors wie z.B. MV_{ox} könnte schließlich ein reiner C_{ox}-Zustand erreicht werden. Analog zu der hier beobachteten Zerstörung des C-Cluster könnte versucht werden unter reduktiven Bedingungen, ausgehend von der Apo-CODH-II_{Ch}, *in vitro* einen C-Cluster aufzubauen.

CODH-IV_{Ch} konnte als ein hocheffizientes Enzym identifiziert werden, welches die CO-Oxidation nahe dem Diffusionslimit katalysiert und eine höhere O₂-Toleranz als CODH-II_{Ch} aufweist. Strukturell unterscheidet sich CODH-IV_{Ch} kaum von CODH-II_{Ch}, allerdings konnten in CODH-IV_{Ch} an der Rückseite des C-Clusters sperrige Proteinreste (F312 und Q559) ausgemacht werden, welche in CODH-II_{Ch} durch einen Serin- und einen Methionin-Rest ersetzt sind. Um zu überprüfen, ob diese Proteinreste zur O₂-Toleranz beitragen könnten, sollten Enzymvarianten der CODH-IV und CODH-II erstellt und dann deren Verhalten gegenüber O₂, wie es bereits für den CODH-IV und CODH-II Wildtyp beschrieben wurde, charakterisiert werden. Die Lösung der Struktur der CODH-IV_{Ch} bei höherer Auflösung ($d_{\min} < 2.0 \text{ \AA}$) könnte weitere Hinweise zur Ursache der erhöhten O₂-Toleranz und katalytischen Perfektion liefern. So könnte z.B. der Verlauf der Gaskanäle des Enzyms genauer beschrieben werden. Auch eine Behandlung der CODH-IV_{Ch} mit Xenon, welches in hydrophoben Kavitäten bindet, könnte Informationen zur Beschaffenheit der Gaskanäle in CODH-IV_{Ch} liefern.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adams PD, Afonine PV, Bunkoczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH (2010): PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66** (Pt 2), 213–221. DOI: 10.1107/S0907444909052925.

Agarwal A, Li D, Cowan JA (1995): Role of aromatic residues in stabilization of the Fe₄S₄ cluster in high-potential iron proteins (HiPIPs): physical characterization and stability studies of Tyr-19 mutants of Chromatium vinosum HiPIP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (21), 9440–9444.

Alberty RA und Hammes GG (1958): Application of the Theory of Diffusion-controlled Reactions to Enzyme Kinetics. *The Journal of Physical Chemistry* (62 (2)), 154–159.

Amara P, Mouesca J-M, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC (2011): Carbon monoxide dehydrogenase reaction mechanism: a likely case of abnormal CO₂ insertion to a Ni-H(-) bond. *Inorg Chem* **50** (5), 1868–1878. DOI: 10.1021/ic102304m.

Anderson ME und Lindahl PA (1996): Spectroscopic states of the CO oxidation/CO₂ reduction active site of carbon monoxide dehydrogenase and mechanistic implications. *Biochemistry* **35** (25), 8371–8380. DOI: 10.1021/bi952902w.

Appel AM, Bercaw JE, Bocarsly AB, Dobbek H, DuBois DL, Dupuis M, Ferry JG, Fujita E, Hille R, Kenis PJA, Kerfeld CA, Morris RH, Peden CHF, Portis AR, Ragsdale SW, Rauchfuss TB, Reek JNH, Seefeldt LC, Thauer RK, Waldrop GL (2013): Frontiers, Opportunities, and Challenges in Biochemical and Chemical Catalysis of CO₂ Fixation. *Chem Rev* **113** (8), 6621–6658. DOI: 10.1021/cr300463y.

Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001): Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (18), 10037–10041. DOI: 10.1073/pnas.181342398.

Bar-Even A, Milo R, Noor E, Tawfik DS (2015): The Moderately Efficient Enzyme: Futile Encounters and Enzyme Floppiness. *Biochemistry* **54** (32), 4969–4977. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00621.

Battye TGG, Kontogiannis L, Johnson O, Powell HR, Leslie AGW (2011): iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67** (Pt 4), 271–281. DOI: 10.1107/S0907444910048675.

Bertini I, Cowan JA, Luchinat C, Natarajan K, Piccioli M (1997): Characterization of a partially unfolded high potential iron protein. *Biochemistry* **36** (31), 9332–9339. DOI: 10.1021/bi970810w.

Bonam D, Murrell SA, Ludden PW (1984): Carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **159** (2), 693–699.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Buhrke T, Lenz O, Krauss N, Friedrich B (2005): Oxygen tolerance of the H₂-sensing NiFe hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J Biol Chem* **280** (25), 23791–23796. DOI: 10.1074/jbc.M503260200.

- Burkhardt A, Pakendorf T, Reime B, Meyer J, Fischer P, Stuebe N, Panneerselvam S, Lorbeer O, Stachnik K, Warmer M, Roedig P, Goeries D, Meents A (2016): Status of the crystallography beamlines at PETRA III. *EUROPEAN PHYSICAL JOURNAL PLUS* **131** (3), 1–9. DOI: 10.1140/epjp/i2016-16056-0.
- Canfield DE, Habicht KS, Thamdrup B (2000): The Archean sulfur cycle and the early history of atmospheric oxygen. *Science* **288** (5466), 658–661.
- Chandramouli K, Unciuleac M-C, Naik S, Dean DR, Huynh BH, Johnson MK (2007): Formation and properties of 4Fe-4S clusters on the IscU scaffold protein. *Biochemistry* **46** (23), 6804–6811. DOI: 10.1021/bi6026659.
- Ciaccafava A, Tombolelli D, Domnik L, Fessler J, Jeoung J-H, Dobbek H, Mroginiski MA, Zebger I, Hildebrandt P (2016): When the inhibitor tells more than the substrate: the cyanide-bound state of a carbon monoxide dehydrogenase. *CHEMICAL SCIENCE* **7** (5), 3162–3171. DOI: 10.1039/c5sc04554a.
- Ciaccafava A, Tombolelli D, Domnik L, Jeoung J-H, Dobbek H, Mroginiski M-A, Zebger I, Hildebrandt P (2017): Carbon Monoxide Dehydrogenase Reduces Cyanate to Cyanide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **113**, 6621. DOI: 10.1002/anie.201703225.
- Cohen J, Kim K, Posewitz M, Ghirardi ML, Schulten K, Seibert M, King P (2005): Molecular dynamics and experimental investigation of H(2) and O(2) diffusion in Fe-hydrogenase. *Biochem Soc Trans* **33** (Pt 1), 80–82. DOI: 10.1042/BST0330080.
- Copeland, Robert Allen (2000): Enzymes. A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2nd ed. New York: J. Wiley. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10299304>.
- Crack JC, Gaskell AA, Green J, Cheesman MR, Le Brun NE, Thomson AJ (2008): Influence of the environment on the 4Fe-4S₂⁺ to 2Fe-2S₂⁺ cluster switch in the transcriptional regulator FNR. *J Am Chem Soc* **130** (5), 1749–1758. DOI: 10.1021/ja077455.
- Craft JL, Ludden PW, Brunold TC (2002): Spectroscopic studies of nickel-deficient carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*: nature of the iron-sulfur clusters. *Biochemistry* **41** (5), 1681–1688.
- DeRose VJ, Telser J, Anderson ME, Lindahl PA, Hoffman BM (1998): A Multinuclear ENDOR Study of the C-Cluster in CO Dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. Evidence for H x O and Histidine Coordination to the [Fe₄S₄] Center. *J. Am. Chem. Soc.* **120** (34), 8767–8776. DOI: 10.1021/ja9731480.
- Diederichs K und Karplus PA (1997): Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nat Struct Biol* **4** (4), 269–275.
- Dobbek H, Gremer L, Kiefersauer R, Huber R, Meyer O (2002): Catalysis at a dinuclear CuSMo(=O)OH cluster in a CO dehydrogenase resolved at 1.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (25), 15971–15976. DOI: 10.1073/pnas.212640899.
- Dobbek H, Gremer L, Meyer O, Huber R (1999): Crystal structure and mechanism of CO dehydrogenase, a molybdo iron-sulfur flavoprotein containing S-selenylcysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (16), 8884–8889.
- Dobbek H, Svetlitchnyi V, Gremer L, Huber R, Meyer O (2001): Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a Ni-4Fe-5S cluster. *Science* **293** (5533), 1281–1285. DOI: 10.1126/science.1061500.

-
- Dobbek H, Svetlitchnyi V, Liss J, Meyer O (2004): Carbon monoxide induced decomposition of the active site Ni-4Fe-5S cluster of CO dehydrogenase. *J Am Chem Soc* **126** (17), 5382–5387. DOI: 10.1021/ja037776v.
- Domnik L, Merrouch M, Goetzl S, Jeoung J-H, Léger C, Dementin S, Fourmond V, Dobbek H (2017): CODH-IV: A novel high efficiency CO-scavenging CO dehydrogenase with increased resistance to O₂. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1521–3773. DOI: 10.1002/anie.201709261.
- Doukov TI, Blasiak LC, Seravalli J, Ragsdale SW, Drennan CL (2008): Xenon in and at the end of the tunnel of bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Biochemistry* **47** (11), 3474–3483. DOI: 10.1021/bi702386t.
- Doukov TI, Iverson TM, Seravalli J, Ragsdale SW, Drennan CL (2002): A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* **298** (5593), 567–572. DOI: 10.1126/science.1075843.
- Drake HL (1982): Occurrence of nickel in carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium pasteurianum* and *Clostridium thermoaceticum*. *J Bacteriol* **149** (2), 561–566.
- Drennan CL, Heo J, Sintchak MD, Schreiter E, Ludden PW (2001): Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (21), 11973–11978. DOI: 10.1073/pnas.211429998.
- Duin EC, Lafferty ME, Crouse BR, Allen RM, Sanyal I, Flint DH, Johnson MK (1997): 2Fe-2S to 4Fe-4S cluster conversion in *Escherichia coli* biotin synthase. *Biochemistry* **36** (39), 11811–11820. DOI: 10.1021/bi9706430.
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K (2010): Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66** (Pt 4), 486–501. DOI: 10.1107/S0907444910007493.
- Ensign SA, Hyman MR, Ludden PW (1989): Nickel-specific, slow-binding inhibition of carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* by cyanide. *Biochemistry* **28** (12), 4973–4979. DOI: 10.1021/bi00438a011.
- Feng J und Lindahl PA (2004a): Carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*: effect of redox potential on catalysis. *Biochemistry* **43** (6), 1552–1559. DOI: 10.1021/bi0357199.
- Feng J und Lindahl PA (2004b): Effect of sodium sulfide on Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *J Am Chem Soc* **126** (29), 9094–9100. DOI: 10.1021/ja048811g.
- Fersht, Alan (1999): Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. 1. printing. New York: W. H. Freeman.
- Fessler J (2011): Untersuchungen zur Struktur und Funktion des Rubrerythrins und seiner putativen FAD-haltigen Reuktase aus *Carboxydothemus hydrogenoformans*, Masterarbeit, Universität Bayreuth.
- Fessler J (2015): Biochemische und strukturelle Untersuchungen der Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen CODH-II und CODH-V aus *Carboxydothemus hydrogenoformans*, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Fessler J, Jeoung J-H, Dobbek H (2015): How the NiFe₄S₄ Cluster of CO Dehydrogenase Activates CO₂ and NCO(-). *Angew Chem Int Ed Engl* **54** (29), 8560–8564. DOI: 10.1002/anie.201501778.

- Flint DH, Smyk-Randall E, Tuminello JF, Draczynska-Lusiak B, Brown OR (1993a): The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J Biol Chem* **268** (34), 25547–25552.
- Flint DH, Tuminello JF, Emptage MH (1993b): The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J Biol Chem* **268** (30), 22369–22376.
- Fox JD, He Y, Shelver D, Roberts GP, Ludden PW (1996): Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol* **178** (21), 6200–6208.
- Fraser DM und Lindahl PA (1999): Evidence for a proposed intermediate redox state in the CO/CO(2) active site of acetyl-CoA synthase (Carbon monoxide dehydrogenase) from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry* **38** (48), 15706–15711.
- Gitlin I, Carbeck JD, Whitesides GM (2006): Why are proteins charged? Networks of charge-charge interactions in proteins measured by charge ladders and capillary electrophoresis. *Angew Chem Int Ed Engl* **45** (19), 3022–3060. DOI: 10.1002/anie.200502530.
- Gnida M, Ferner R, Gremer L, Meyer O, Meyer-Klaucke W (2003): A novel binuclear CuSMo cluster at the active site of carbon monoxide dehydrogenase: characterization by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* **42** (1), 222–230. DOI: 10.1021/bi026514n.
- Goetzl S (2009): Funktionelle Charakterisierung von Ni,Fe-haltigen Kohlenmonoxid-Dehydrogenasen und ihren assoziierten Ferredoxinen, Diplomarbeit, Universität Bayreuth.
- Gong W, Hao B, Wei Z, Ferguson DJ, JR., Tallant T, Krzycki JA, Chan MK (2008): Structure of the alpha(2)epsilon(2) Ni-dependent CO dehydrogenase component of the *Methanosarcina barkeri* acetyl-CoA decarbonylase/synthase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** (28), 9558–9563. DOI: 10.1073/pnas.0800415105.
- Grahame DA und DeMoll E (1995): Substrate and accessory protein requirements and thermodynamics of acetyl-CoA synthesis and cleavage in *Methanosarcina barkeri*. *Biochemistry* **34** (14), 4617–4624.
- Gruer MJ und Guest JR (1994): Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, Engl)* **140** (Pt 10), 2531–2541. DOI: 10.1099/00221287-140-10-2531.
- Ha S-W, Korbass M, Klepsch M, Meyer-Klaucke W, Meyer O, Svetlitchnyi V (2007): Interaction of potassium cyanide with the Ni-4Fe-5S active site cluster of CO dehydrogenase from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J Biol Chem* **282** (14), 10639–10646. DOI: 10.1074/jbc.M610641200.
- Hallenbeck PC, George GN, Prince RC, Thorneley RNF (2009): Characterization of a modified nitrogenase Fe protein from *Klebsiella pneumoniae* in which the 4Fe4S cluster has been replaced by a 4Fe4Se cluster. *J Biol Inorg Chem* **14** (5), 673–682. DOI: 10.1007/s00775-009-0480-1.
- Hänzelmann P, Dobbek H, Gremer L, Huber R, Meyer O (2000): The effect of intracellular molybdenum in *Hydrogenophaga pseudoflava* on the crystallographic structure of the seleno-molybdo-iron-sulfur flavoenzyme carbon monoxide dehydrogenase. *J Mol Biol* **301** (5), 1221–1235. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4023.

-
- Heo J, Wolfe MT, Staples CR, Ludden PW (2002): Converting the NiFeS carbon monoxide dehydrogenase to a hydrogenase and a hydroxylamine reductase. *J Bacteriol* **184** (21), 5894–5897.
- Hochkoeppler A, Kofod P, Ferro G, Ciurli S (1995): Isolation, characterization, and functional role of the high-potential iron-sulfur protein (HiPIP) from *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Biochem Biophys* **322** (2), 313–318. DOI: 10.1006/abbi.1995.1469.
- Holland HD (2002): Volcanic gases, black smokers, and the Great Oxidation Event. *GEOCHIMICA ET COSMOCHIMICA ACTA* **66** (21), 3811–3826.
- Holland HD (2006): The oxygenation of the atmosphere and oceans. *PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES* **361** (1470), 903–915. DOI: 10.1098/rstb.2006.1838.
- Hu Z, Spangler NJ, Anderson ME, Xia J, Ludden PW, Lindahl PA, Münck E (1996): Nature of the C-Cluster in Ni-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* **118** (4), 830–845. DOI: 10.1021/ja9528386.
- Ibers JA und Holm RH (1980): Modeling coordination sites in metallobiomolecules. *Science* **209** (4453), 223–235.
- Imlay JA (2003): Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**, 395–418. DOI: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.
- Imlay JA (2006): Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59** (4), 1073–1082. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05028.x.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96** (1), 23–28. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-P.
- Inoue T, Takao K, Yoshida T, Wada K, Daifuku T, Yoneda Y, Fukuyama K, Sako Y (2013): Cysteine 295 indirectly affects Ni coordination of carbon monoxide dehydrogenase-II C-cluster. *Biochem Biophys Res Commun* **441** (1), 13–17. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.143.
- Janiak C, Meyer H-J, Gudat D, Alsfasser R (2012): Riedel Moderne Anorganische Chemie. 4. Auflage. Hg. v. Hans-Jürgen Meyer. Berlin/Boston: de Gruyter (De Gruyter Studium).
- Jeoung J-H (2008): Anaerobic Carbon Monoxide Dehydrogenase: Mechanism of CO-Oxidation at the [NiFe₄S₄OH_x] Cluster and Ni-Processing by its ATPase CooC, Dissertation, Universität Bayreuth.
- Jeoung J-H und Dobbek H (2007): Carbon dioxide activation at the Ni,Fe-cluster of anaerobic carbon monoxide dehydrogenase. *Science* **318** (5855), 1461–1464. DOI: 10.1126/science.1148481.
- Jeoung J-H und Dobbek H (2009): Structural basis of cyanide inhibition of Ni, Fe-containing carbon monoxide dehydrogenase. *J Am Chem Soc* **131** (29), 9922–9923. DOI: 10.1021/ja9046476.
- Jeoung J-H und Dobbek H (2012): n-Butyl isocyanide oxidation at the NiFe₄S₄OH(x) cluster of CO dehydrogenase. *J Biol Inorg Chem* **17** (2), 167–173. DOI: 10.1007/s00775-011-0839-y.
- Jeoung J-H, Fessler J, Goetzl S, Dobbek H (2014a): Carbon monoxide. Toxic gas and fuel for anaerobes and aerobes: carbon monoxide dehydrogenases. *Met Ions Life Sci* **14**, 37–69. DOI: 10.1007/978-94-017-9269-1_3.

Jeoung J-H, Fessler J, Goetzl S, Dobbek H (2014b): Carbon monoxide. Toxic gas and fuel for anaerobes and aerobes: carbon monoxide dehydrogenases. *Met Ions Life Sci* **14**, 37–69. DOI: 10.1007/978-94-017-9269-1_3.

Jeoung J-H, Goetzl S, Hennig SE, Fessler J, Wormann C, Dendra J, Dobbek H (2014c): The extended reductive acetyl-CoA pathway: ATPases in metal cluster maturation and reductive activation. *Biol Chem* **395** (5), 545–558. DOI: 10.1515/hsz-2013-0290.

Jervis AJ, Crack JC, White G, Artymiuk PJ, Cheesman MR, Thomson AJ, Le Brun NE, Green J (2009): The O₂ sensitivity of the transcription factor FNR is controlled by Ser24 modulating the kinetics of 4Fe-4S to 2Fe-2S conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (12), 4659–4664. DOI: 10.1073/pnas.0804943106.

Jung YS, Bonagura CA, Tilley GJ, Gao-Sheridan HS, Armstrong FA, Stout CD, Burgess BK (2000): Structure of C42D *Azotobacter vinelandii* FdI. A Cys-X-X-Asp-X-X-Cys motif ligates an air-stable 4Fe-4S^{2+/+} cluster. *J Biol Chem* **275** (47), 36974–36983. DOI: 10.1074/jbc.M004947200.

Kaim, Wolfgang; Schwederski, Brigitte (2005): Bioanorganische Chemie. Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen. 4., durchges. Aufl. Wiesbaden: Teubner (Lehrbuch : Chemie).

Kamps A, Achebach S, Fedtke I, Uuden G, Götz F (2004): Staphylococcal NreB: an O(2)-sensing histidine protein kinase with an O(2)-labile iron-sulphur cluster of the FNR type. *Mol Microbiol* **52** (3), 713–723. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04024.x.

Karplus PA und Diederichs K (2012): Linking crystallographic model and data quality. *Science* **336** (6084), 1030–1033. DOI: 10.1126/science.1218231.

Keyer K und Imlay JA (1996): Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (24), 13635–13640.

Kim EJ, Feng J, Bramlett MR, Lindahl PA (2004): Evidence for a proton transfer network and a required persulfide-bond-forming cysteine residue in Ni-containing carbon monoxide dehydrogenases. *Biochemistry* **43** (19), 5728–5734. DOI: 10.1021/bi036062u.

Kobayashi K, Mizuno M, Fujikawa M, Mizutani Y (2011): Protein conformational changes of the oxidative stress sensor, SoxR, upon redox changes of the 2Fe-2S cluster probed with ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry* **50** (44), 9468–9474. DOI: 10.1021/bi201526y.

Kumar M, Lu WP, Liu L, Ragsdale SW (1993): Kinetic evidence that carbon monoxide dehydrogenase catalyzes the oxidation of carbon monoxide and the synthesis of acetyl-CoA at separate metal clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **115** (24), 11646–11647. DOI: 10.1021/ja00077a093.

Kumar M und Ragsdale SW (1995): n-Butyl isocyanide. A structural and functional analog of carbon monoxide for carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Am. Chem. Soc.* **117** (46), 11604–11605. DOI: 10.1021/ja00151a036.

Kung Y, Doukov TI, Seravalli J, Ragsdale SW, Drennan CL (2009): Crystallographic snapshots of cyanide- and water-bound C-clusters from bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Biochemistry* **48** (31), 7432–7440. DOI: 10.1021/bi900574h.

Kung Y und Drennan CL (2011): A role for nickel-iron cofactors in biological carbon monoxide and carbon dioxide utilization. *CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY* **15** (2), 276–283. DOI: 10.1016/j.cbpa.2010.11.005.

-
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259), 680–685.
- Lapid C und Gao Y (2010): PrimerX. Online verfügbar unter <http://www.bioinformatics.org/primerx/>, zuletzt aktualisiert am 09.01.2010, zuletzt geprüft am 09.08.2017.
- Leatherbarrow RJ (2009): GraFit Version 7. Version : Erithacus Software Ltd., Horley, U.K.
- Leger C, Dementin S, Bertrand P, Rousset M, Guigliarelli B (2004): Inhibition and aerobic inactivation kinetics of *Desulfovibrio fructosovorans* NiFe hydrogenase studied by protein film voltammetry. *J Am Chem Soc* **126** (38), 12162–12172. DOI: 10.1021/ja046548d.
- Lindahl PA (2002): The Ni-containing carbon monoxide dehydrogenase family: light at the end of the tunnel? *Biochemistry* **41** (7), 2097–2105.
- Lindahl PA (2012): Metal-metal bonds in biology. *J Inorg Biochem* **106** (1), 172–178. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.08.012.
- Lindahl PA, Münck E, Ragsdale SW (1990a): CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. EPR and electrochemical studies in CO₂ and argon atmospheres. *J Biol Chem* **265** (7), 3873–3879.
- Lindahl PA, Ragsdale SW, Münck E (1990b): Mössbauer study of CO dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *J Biol Chem* **265** (7), 3880–3888.
- Liochev SI und Fridovich I (1992): Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (13), 5892–5896.
- Liochev SI und Fridovich I (1994): The role of O₂·- in the production of HO·: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* **16** (1), 29–33.
- Lunin VY, Afonine PV, Urzhumtsev AG (2002): Likelihood-based refinement. I. Irremovable model errors. *Acta Crystallogr, A, Found Crystallogr* **58** (Pt 3), 270–282.
- Matson EG, Gora KG, Leadbetter JR (2011): Anaerobic carbon monoxide dehydrogenase diversity in the homoacetogenic hindgut microbial communities of lower termites and the wood roach. *PLoS ONE* **6** (4), e19316. DOI: 10.1371/journal.pone.0019316.
- Matthews BW (1968): Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33** (2), 491–497.
- McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ (2007): Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40** (Pt 4), 658–674. DOI: 10.1107/S0021889807021206.
- Meents A, Reime B, Stuebe N, Fischer P, Warmer M, Goeries D, Roever J, Meyer J, Fischer J, Burkhardt A, Vartiainen I, Karvinen P, David C (2013): Development of an in-vacuum x-ray microscope with cryogenic sample cooling for beamline P11 at PETRA III. In: Barry Lai (Hg.). SPIE Optical Engineering + Applications. San Diego, California, United States, Sunday 25 August 2013: SPIE (SPIE Proceedings), 88510K.
- Merrouch M, Hadj-Said J, Domnik L, Dobbek H, Leger C, Dementin S, Fourmond V (2015): O₂ Inhibition of Ni-Containing CO Dehydrogenase Is Partly Reversible. *Chemistry* **21** (52), 18934–18938. DOI: 10.1002/chem.201502835.
- Merrouch M, Hadj-Saïd J, Léger C, Dementin S, Fourmond V (2017): Reliable estimation of the kinetic parameters of redox enzymes by taking into account mass transport towards rotating electrodes in protein film voltammetry experiments. *Electrochimica Acta*. DOI: 10.1016/j.electacta.2017.03.114.

- Messner KR und Imlay JA (1999): The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **274** (15), 10119–10128. DOI: 10.1074/jbc.274.15.10119.
- Messner KR und Imlay JA (2002): Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. *J Biol Chem* **277** (45), 42563–42571. DOI: 10.1074/jbc.M204958200.
- Möller-Zinkhan D und Thauer RK (1990): Anaerobic lactate oxidation to 3 CO₂ by *Archaeoglobus fulgidus* via the carbon monoxide dehydrogenase pathway. Demonstration of the acetyl-CoA carbon-carbon cleavage reaction in cell extracts. *Arch. Microbiol.* **153** (3), 215–218. DOI: 10.1007/BF00249070.
- Montet Y, Amara P, Volbeda A, Vernede X, Hatchikian EC, Field MJ, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1997): Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Mol Biol* **4** (7), 523–526. DOI: 10.1038/nsb0797-523.
- Moulis JM und Meyer J (2002): Characterization of the selenium-substituted 2[4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **21** (19), 4762–4771. DOI: 10.1021/bi00262a037.
- Mueller U, Darowski N, Fuchs, Martin R., Förster, Ronald, Hellmig M, Paithankar KS, Pühringer S, Steffien M, Zocher G, Weiss MS (2012): Facilities for macromolecular crystallography at the Helmholtz-Zentrum Berlin. *Synchrotron Radiation* (19), 442–449.
- Mulholland SE, Gibney BR, Rabanal F, Dutton PL (1999): Determination of nonligand amino acids critical to 4Fe-4S₂^{+/+} assembly in ferredoxin maquettes. *Biochemistry* **38** (32), 10442–10448. DOI: 10.1021/bi9908742.
- Müllner M, Hammel O, Mienert B, Schlag S, Bill E, Uden G (2008): A PAS domain with an oxygen labile 4Fe-4S(2+) cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*. *Biochemistry* **47** (52), 13921–13932. DOI: 10.1021/bi8014086.
- Nakamura M, Saeki K, Takahashi Y (1999): Hyperproduction of Recombinant Ferredoxins in *Escherichia coli* by Coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 Gene Cluster1. *Journal of Biological Chemistry* (26), 10–18.
- Nicolet Y, Piras C, Legrand P, Hatchikian CE, Fontecilla-Camps JC (1999): Desulfovibrio desulfuricans iron hydrogenase. The structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* **7** (1), 13–23. DOI: 10.1016/S0969-2126(99)80005-7.
- Nicolet Y, Rohac R, Martin L, Fontecilla-Camps JC (2013): X-ray snapshots of possible intermediates in the time course of synthesis and degradation of protein-bound Fe₄S₄ clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (18), 7188–7192. DOI: 10.1073/pnas.1302388110.
- Noth J, Esselborn J, Güldenhaupt J, Brünje A, Sawyer A, Apfel U-P, Gerwert K, Hofmann E, Winkler M, Happe T (2016): FeFe-Hydrogenase with Chalcogenide Substitutions at the H-Cluster Maintains Full H₂ Evolution Activity. *Angew Chem Int Ed Engl* **55** (29), 8396–8400. DOI: 10.1002/anie.201511896.
- Rebelein JG, Stiebritz MT, Lee CC, Hu Y (2017): Activation and reduction of carbon dioxide by nitrogenase iron proteins. *Nat Chem Biol* **13** (2), 147–149. DOI: 10.1038/nchembio.2245.
- Rees DC (2002): Great metallocusters in enzymology. *Annu Rev Biochem* **71**, 221–246. DOI: 10.1146/annurev.biochem.71.110601.135406.

-
- Reinhart F, Huber A, Thiele R, Unden G (2010): Response of the oxygen sensor NreB to air in vivo: Fe-S-containing NreB and apo-NreB in aerobically and anaerobically growing *Staphylococcus carnosus*. *J Bacteriol* **192** (1), 86–93. DOI: 10.1128/JB.01248-09.
- Seefeldt LC und Ensign SA (1994): A continuous, spectrophotometric activity assay for nitrogenase using the reductant titanium(III) citrate. *Anal Biochem* **221** (2), 379–386. DOI: 10.1006/abio.1994.1429.
- Seravalli J, Kumar M, Lu WP, Ragsdale SW (1995): Mechanism of CO oxidation by carbon monoxide dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum* and its inhibition by anions. *Biochemistry* **34** (24), 7879–7888.
- Seravalli J, Kumar M, Lu WP, Ragsdale SW (1997): Mechanism of carbon monoxide oxidation by the carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase from *Clostridium thermoaceticum*: kinetic characterization of the intermediates. *Biochemistry* **36** (37), 11241–11251. DOI: 10.1021/bi970590m.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG (2011): Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **7**, 539. DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- Sleep NH und Bird DK (2008): Evolutionary ecology during the rise of dioxygen in the Earth's atmosphere. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **363** (1504), 2651–2664. DOI: 10.1098/rstb.2008.0018.
- Soboh B, Linder D, Hedderich R (2002): Purification and catalytic properties of a CO-oxidizing:H₂-evolving enzyme complex from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Eur J Biochem* **269** (22), 5712–5721.
- Spangler NJ, Lindahl PA, Bandarian V, Ludden PW (1996): Spectroelectrochemical characterization of the metal centers in carbon monoxide dehydrogenase (CODH) and nickel-deficient CODH from *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem* **271** (14), 7973–7977.
- Spangler NJ, Meyers MR, Gierke KL, Kerby RL, Roberts GP, Ludden PW (1998): Substitution of valine for histidine 265 in carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* affects activity and spectroscopic states. *J Biol Chem* **273** (7), 4059–4064.
- Sparta KM, Krug M, Heinemann U, Mueller U, Weiss MS (2016): XDSAPP2.0. *Journal of Applied Crystallography* (49), 1085–1092.
- Staples CR, Heo J, Spangler NJ, Kerby RL, Roberts GP, Ludden PW (1999): *Rhodospirillum rubrum* CO-Dehydrogenase. Part 1. Spectroscopic Studies of CODH Variant C531A Indicate the Presence of a Binuclear [FeNi] Cluster. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (48), 11034–11044. DOI: 10.1021/ja990396i.
- Svetlichny VA, Sokolova TG, Gerhardt M, Ringpfeil M, Kostrikina NA, Zavarzin GA (1991): *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing Thermophilic Anaerobic Bacterium from Hydrothermal Environments of Kunashir Island. *Systematic and Applied Microbiology* **14** (3), 254–260. DOI: 10.1016/S0723-2020(11)80377-2.
- Svetlitchnyi V, Dobbek H, Meyer-Klaucke W, Meins T, Thiele B, Römer P, Huber R, Meyer O (2004): A functional Ni-Ni-4Fe-4S cluster in the monomeric acetyl-CoA synthase from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (2), 446–451. DOI: 10.1073/pnas.0304262101.

- Svetlitchnyi V, Peschel C, Acker G, Meyer O (2001): Two membrane-associated NiFeS-carbon monoxide dehydrogenases from the anaerobic carbon-monoxide-utilizing eubacterium *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. *J Bacteriol* **183** (17), 5134–5144.
- Tan KP, Nguyen TB, Patel S, Varadarajan R, Madhusudhan MS (2013): Depth: a web server to compute depth, cavity sizes, detect potential small-molecule ligand-binding cavities and predict the pKa of ionizable residues in proteins. *Nucleic Acids Res* **41** (Web Server issue), W314–21. DOI: 10.1093/nar/gkt503.
- Tse Sum Bui B, Benda R, Schünemann V, Florentin D, Trautwein AX, Marquet A (2003): Fate of the (2Fe-2S)(2+) cluster of *Escherichia coli* biotin synthase during reaction: a Mössbauer characterization. *Biochemistry* **42** (29), 8791–8798. DOI: 10.1021/bi034426c.
- Ugulava NB, Gibney BR, Jarrett JT (2001): Biotin synthase contains two distinct iron-sulfur cluster binding sites: chemical and spectroelectrochemical analysis of iron-sulfur cluster interconversions. *Biochemistry* **40** (28), 8343–8351.
- Vagin AA, Steiner RA, Lebedev AA, Potterton L, McNicholas S, Long F, Murshudov GN (2004): REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60** (Pt 12 Pt 1), 2184–2195. DOI: 10.1107/S0907444904023510.
- Volbeda A (2002): High-resolution crystallographic analysis of *Desulfovibrio fructosovorans* 6NiFe9 hydrogenase. *International Journal of Hydrogen Energy* **27** (11–12), 1449–1461. DOI: 10.1016/S0360-3199(02)00072-1.
- Wächtershäuser G (2007): On the chemistry and evolution of the pioneer organism. *Chem Biodivers* **4** (4), 584–602. DOI: 10.1002/cbdv.200790052.
- Wandersman C und Delepelaire P (2004): Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**, 611–647. DOI: 10.1146/annurev.micro.58.030603.123811.
- Wang P-h, Bruschi M, Gioia L de, Blumberger J (2013a): Uncovering a dynamically formed substrate access tunnel in carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *J Am Chem Soc* **135** (25), 9493–9502. DOI: 10.1021/ja403110s.
- Wang VC-C, Can M, Pierce E, Ragsdale SW, Armstrong FA (2013b): A unified electrocatalytic description of the action of inhibitors of nickel carbon monoxide dehydrogenase. *J Am Chem Soc* **135** (6), 2198–2206. DOI: 10.1021/ja308493k.
- Wang VC-C, Islam STA, Can M, Ragsdale SW, Armstrong FA (2015): Investigations by Protein Film Electrochemistry of Alternative Reactions of Nickel-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenase. *J Phys Chem B* **119** (43), 13690–13697. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03098.
- Wang VC-C, Ragsdale SW, Armstrong FA (2013c): Investigations of two bidirectional carbon monoxide dehydrogenases from *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* by protein film electrochemistry. *Chembiochem* **14** (14), 1845–1851. DOI: 10.1002/cbic.201300270.
- Weiss MS (2001): Global indicators of X-ray data quality. *J Appl Crystallogr* **34** (2), 130–135. DOI: 10.1107/s0021889800018227.
- Wilcoxon J und Hille R (2013): The hydrogenase activity of the molybdenum/copper-containing carbon monoxide dehydrogenase of *Oligotropha carboxidovorans*. *J Biol Chem* **288** (50), 36052–36060. DOI: 10.1074/jbc.M113.522441.

Wilcoxon J, Snider S, Hille R (2011a): Substitution of silver for copper in the binuclear Mo/Cu center of carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *J Am Chem Soc* **133** (33), 12934–12936. DOI: 10.1021/ja205073j.

Wilcoxon J, Zhang B, Hille R (2011b): Reaction of the molybdenum- and copper-containing carbon monoxide dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans* with quinones. *Biochemistry* **50** (11), 1910–1916. DOI: 10.1021/bi1017182.

Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS (2011): Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67** (Pt 4), 235–242. DOI: 10.1107/S0907444910045749.

Wu M, Ren Q, Durkin AS, Daugherty SC, Brinkac LM, Dodson RJ, Madupu R, Sullivan SA, Kolonay JF, Haft DH, Nelson WC, Tallon LJ, Jones KM, Ulrich LE, Gonzalez JM, Zhulin IB, Robb FT, Eisen JA (2005): Life in hot carbon monoxide: the complete genome sequence of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901. *PLoS Genet* **1** (5), e65. DOI: 10.1371/journal.pgen.0010065.

Zhang B, Crack JC, Subramanian S, Green J, Thomson AJ, Le Brun NE, Johnson MK (2012): Reversible cycling between cysteine persulfide-ligated 2Fe-2S and cysteine-ligated 4Fe-4S clusters in the FNR regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (39), 15734–15739. DOI: 10.1073/pnas.1208787109.

Zhang B, Hemann CF, Hille R (2010): Kinetic and spectroscopic studies of the molybdenum-copper CO dehydrogenase from *Oligotropha carboxidovorans*. *J Biol Chem* **285** (17), 12571–12578. DOI: 10.1074/jbc.M109.076851.

7 ANHANG

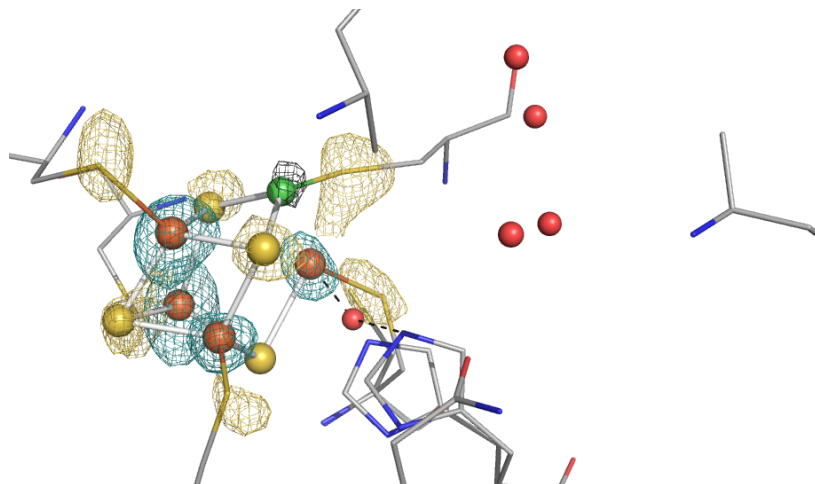


Abbildung A.1: Anomale Differenz-Fourier-Karten der H93AK563A-Variante für Ni (schwarz), Fe (cyan) und S (gelb). Die anomale Differenz-Fourier-Karte für Ni wurde bei 6.0 σ , die Karte für Fe bei 6.0 σ und die Karte für S bei 4.0 σ konturiert.

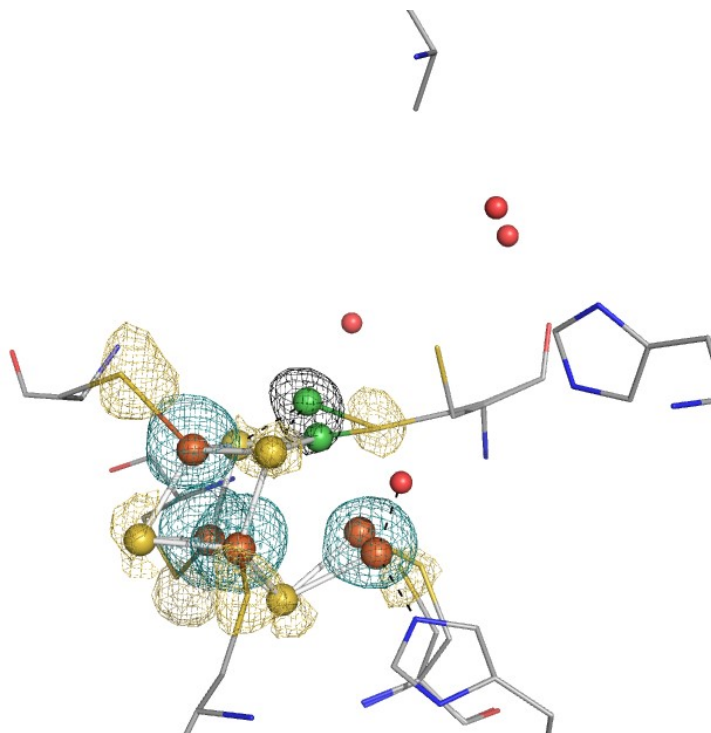


Abbildung A.2: Anomale Differenz-Fourier-Karten der I56A-Variante für Ni (schwarz), Fe (cyan) und S (gelb). Die anomale Differenz-Fourier-Karte für Ni wurde bei 6.0 σ , die Karte für Fe bei 6.0 σ und die Karte für S bei 4.5 σ konturiert.

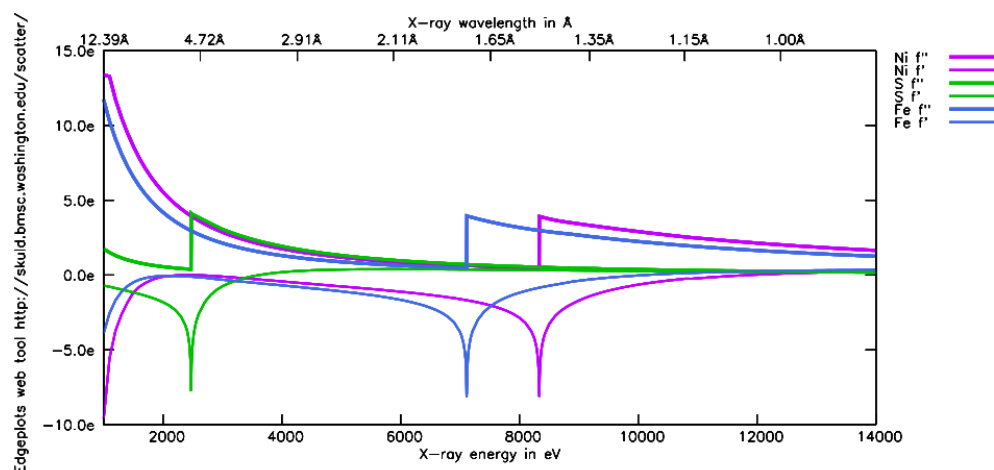


Abbildung A.3: Anomale Streukoeffizienten für Ni, Fe und S. Dargestellt sind die Kurven für die Streukoeffizienten f' und f'' in Abhängigkeit der Röntgen-Energie (eV) bzw. Wellenlänge (Å) für Ni (lila), Fe (blau) und S (grün). Die Abbildung wurde durch ein Online-Tool auf <http://skuld.bmsc.washington.edu/scatter/> erstellt.

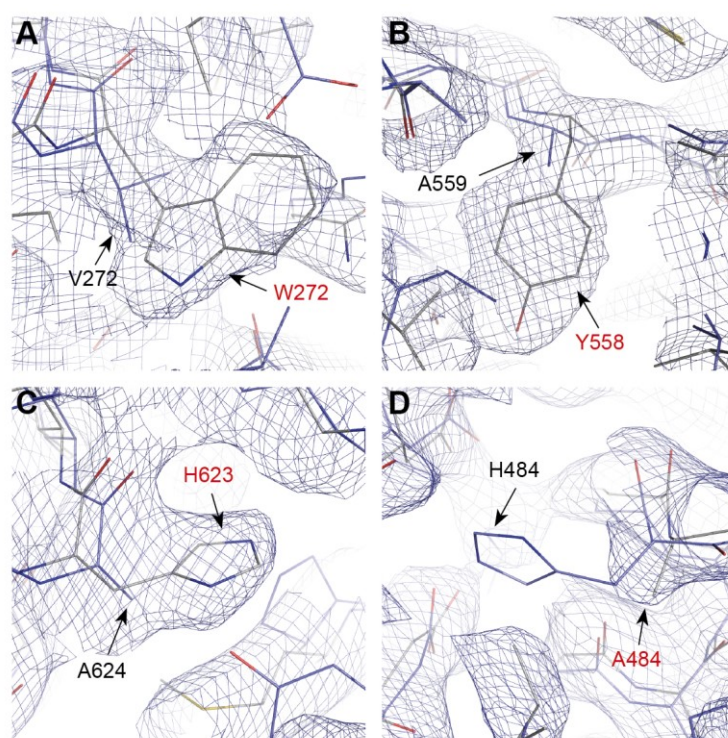


Abbildung A.4: CODH-IV_{Ch} nach Phasierung. Dargestellt ist die Struktur der CODH-IV_{Ch} (rote Beschriftung) nach Phasierung und die Struktur des verwendeten Suchmodells (schwarze Beschriftung, pdb-ID: 3b51). Exemplarisch wurde die Seitenketten W272 (A), Y558(B), H623 (C) und A484 (D) abgebildet. Die $2F_o - F_c$ Karten wurden bei 1.0σ konturiert.

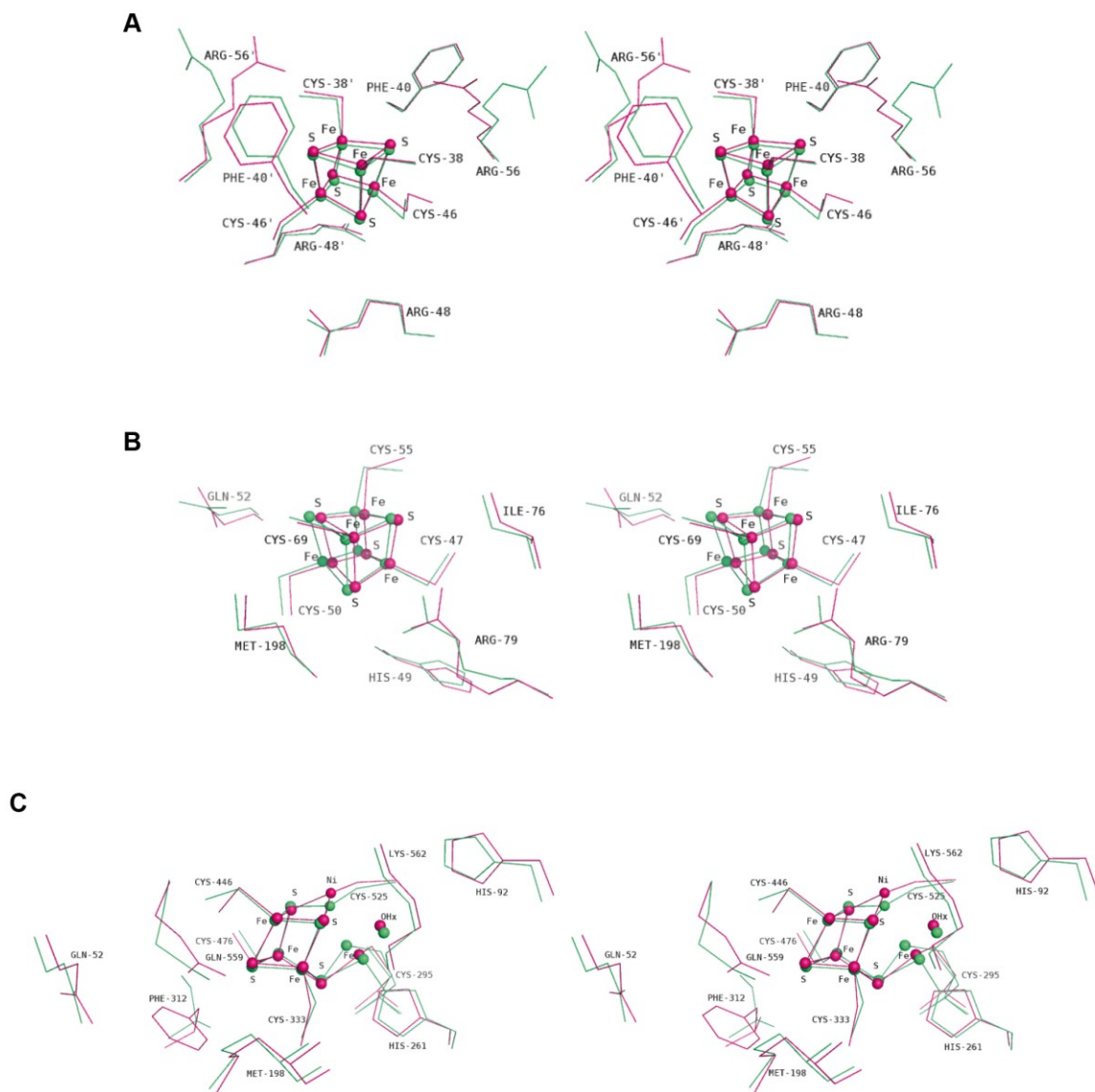


Abbildung A.5: Stereoansicht des D-Clusters (A), B-Clusters (B) und C-Clusters (C) der CODH-IV_{Ch} (pink) und CODH-II_{Ch} (grün).

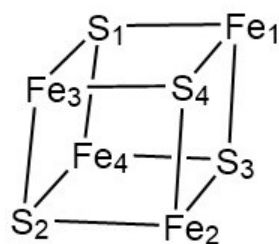


Abbildung A.6: Vereinfachte Darstellung des C-Clusters der K563H- und C295D-Variante. In der K563H-Variante entspricht die Fe_{1A}-Position dem hier dargestellten Fe₁. Auf eine Visualisierung der Fe_{1B}-Position wurde verzichtet.

Tabelle A.1: Geometrie des C-Clusters der K563H- und C295D-Variante.

Bindungslängen [Å]			Bindungswinkel [°]		
	K563H*	C295D		K563H*	C295D
Fe ₁ -S ₁	2.26	2.3	S ₁ -Fe ₁ -S ₄	86.27	95.35
Fe ₁ -S ₃	2.39	2.35	S ₁ -Fe ₁ -S ₃	98.65	94.63
Fe ₁ -S ₄	2.69	2.38	S ₄ -Fe ₁ -S ₃	91.32	102.69
Fe ₁ -S(C526)	2.37	2.41	Fe ₄ -S ₃ -Fe ₁	77.44	78.34
Fe ₂ -S ₂	2.25	2.16	Fe ₄ -S ₃ -Fe ₂	73.72	70.51
Fe ₂ -S ₃	2.28	2.24	Fe ₁ -S ₃ -Fe ₂	82.01	75.00
Fe ₂ -S ₄	2.24	2.33			
Fe ₃ -S ₁	2.23	2.26			
Fe ₃ -S ₂	2.25	2.31			
Fe ₃ -S ₄	2.20	2.27			
Fe ₄ -S ₁	2.25	2.15			
Fe ₄ -S ₂	2.20	2.18			
Fe ₄ -S ₃	2.23	2.21			

*Fe₁ entspricht Fe_{1A}. Auf eine Darstellung der Bindungslängen und Bindungswinkel für Fe_{1B} wurde verzichtet.

Tabelle A.2: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} im *as isolated* Zustand.

	CODH-II <i>as isolated</i>
Datensammlung	
Röntgenquelle	DESY PETRA III, P11
Wellenlänge (Å)	0.91841
Raumgruppe	C2
Zellkonstanten	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.46, 74.90, 71.18
α , β , γ (°)	90.0, 111.2, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	1 046 250 / 154 865
R_{meas} (%) ^a	7.4 (72.1)
$CC_{1/2}$ ^b	99.9 (83.5)
Auflösung (Å)	40.82 – 1.23 (1.27 – 1.23)
Vollständigkeit (%)	97.27 (95.14)
$I / \sigma I$	14.0 (2.4)
Strukturverfeinerung	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%) ^c	10.62 / 14.07
Proteinmoleküle in der ASU	1
Ramachandran-Statistiken (%)	
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.45 / 2.87 / 0.68
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie	
Bindungen (Å)	0.015
Winkel (°)	1.990
ESU ^d	0.02

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (R_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.3: Kristallographische Datentabelle für Varianten der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II H93A	CODH-II K563A	CODH-II H96D ^e
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.2	BESSY II, 14.2	Kupfer- Drehanode
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	1.54
Raumgruppe	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
Zellkonstanten			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.33, 75.17, 71.35	112.10, 75.48, 71.26	112.70, 75.24, 71.22
α , β , γ (°)	90.0, 111.30, 90.0	90.0, 111.35, 90.0	90.0, 111.38, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	574 775 / 156 514	561 567 / 151 514	240 138 / 59 677
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	6.5 (74.1)	9.0 (91.2)	9.4 (32.7) ^f
CC _{1/2} ^b	99.9 (69.9)	99.8 (66.1)	-
Auflösung (Å)	40.86 – 1.23 (1.27 – 1.23)	40.85 – 1.25 (1.29 – 1.25)	19.77 – 1.70 (1.80 – 1.70)
Vollständigkeit (%)	97.89 (92.17)	99.09 (94.25)	98.5 (97.1)
<i>I</i> / σI	13.5 (1.9)	9.3 (1.6)	11.07 (4.54)
Strukturverfeinerung			
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	12.89 / 15.75	15.14 / 18.60	16.11 / 20.79
Proteinmoleküle in der ASU	1	1	1
Ramachandran-Statistiken (%)			
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.52 / 3.16 / 0.32	96.21 / 3.48 / 0.32	96.68 / 3.00 / 0.32
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie			
Bindungen (Å)	0.018	0.021	0.011
Winkel (°)	1.781	1.962	1.632
ESU ^d	0.11	0.14	0.21

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

^e Datensatz wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Jae-Hun Jeoung (Humboldt-Universität zu Berlin).

^f $R_s = \sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)$, *i* sind unabhängige Beobachtungen der Reflexion *h*.

Tabelle A.4: Kristallographische Datentabelle für Varianten der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II H93E	CODH-II H93A K563A
Datensammlung		
Röntgenquelle	BESSY II, 14.2	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.21, 74.84, 71.36	112.22, 75.27, 71.43
α , β , γ (°)	90.0, 111.07, 90.0	90.0, 111.15, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	561 834 / 151 302	561 795 / 152 214
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	7.0 (89.4)	7.3 (130.5)
CC _{1/2} ^b	99.9 (67.4)	99.9 (22.4)
Auflösung (Å)	40.88 – 1.25	40.94 – 1.25
	(1.29 – 1.25)	(1.29 – 1.25)
Vollständigkeit (%)	99.43 (97.27)	99.67 (98.53)
<i>I</i> / σI	11.9 (1.6)	9.3 (0.9)
Strukturverfeinerung		
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	11.71 / 16.64	13.53 / 16.95
Proteinmoleküle in der ASU	1	1
Ramachandran-Statistiken		
(%)		
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.67 / 3.01 / 0.32	97.3 / 2.38 / 0.32
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie		
Bindungen (Å)	0.0140	0.015
Winkel (°)	1.873	1.994
ESU ^d	0.03	0.04

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.5: Kristallographische Datentabelle für die H93AK563A-Variante der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II H93A K563A Ni-Kante	CODH-II H93A K563A <i>pre</i> Ni-Kante	CODH-II H93A K563A Fe-Kante	CODH-II H93A K563A Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Energie (Å)	1.48342	1.4902	1.74086	1.88311
Raumgruppe	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2	<i>C</i> 2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.09, 75.20, 71.30	112.05, 75.21, 71.24	112.29, 75.05, 71.52	112.22, 75.25, 71.45
α , β , γ (°)	90.0, 111.08, 90.0	90.0, 111.06, 90.0	90.0, 111.15, 90.0	90.0, 111.11, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	498 332 / 82 702	530 225 / 78 290	336 949 / 52 586	522 065 / 40 309
R_{meas} (%) ^a	5.9 (50.2)	6.1 (51.7)	8.3 (53.8)	6.4 (22.2)
$CC_{1/2}$ ^b	99.9 (82.0)	99.9 (84.2)	99.8 (81.4)	99.9 (97.6)
Auflösung (Å)	40.91 – 1.53 (1.58 – 1.53)	40.9 – 1.56 (1.61 – 1.56)	40.93 – 1.78 (1.84 – 1.78)	40.96 – 1.95 (2.02 – 1.95)
Vollständigkeit (%)	99.34 (96.47)	99.39 (96.3)	99.03 (93.48)	99.47 (97.36)
<i>I</i> / σI	17.6 (2.7)	16.04 (2.8)	15.1 (2.3)	26.2 (7.5)

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

Tabelle A.6: Kristallographische Datentabelle für Varianten der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II I567A	CODH-II I567L	CODH-II I567T
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	111.67, 75.81, 71.50	112.20, 75.23, 71.41	112.18, 75.42, 71.24
α, β, γ (°)	90.0, 111.11, 90.0	90.0, 111.12, 90.0	90.0, 111.03, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	372 760 / 100 997	322 911 / 97 344	259 738 / 79 508
R_{meas} (%) ^a	6.8 (63.3)	8.3 (81.9)	10.5 (66.9)
$CC_{1/2}$ ^b	99.8 (70.7)	99.8 (56.9)	99.6 (76.0)
Auflösung (Å)	41.01 – 1.43 (1.49 – 1.43)	40.94 – 1.45 (1.50 – 1.45)	40.95 – 1.54 (1.60 – 1.54)
Vollständigkeit (%)	99.38 (97.27)	98.84 (92.48)	97.75 (93.32)
$I / \sigma I$	11.7 (1.9)	10.1 (1.5)	9.2 (1.7)
Strukturverfeinerung			
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%) ^c	15.39 / 17.50	15.45 / 18.05	20.07 / 23.84
Proteinmoleküle in der ASU	1	1	1
Ramachandran-Statistiken (%)			
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	97.30 / 2.38 / 0.32	96.99 / 2.69 / 0.32	96.99 / 2.69 / 0.32
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie			
Bindungen (Å)	0.0128	0.012	0.0150
Winkel (°)	1.936	1.917	1.991
ESU ^d	0.044	0.05	0.08

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (R_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.7: Kristallographische Datentabelle für die I567A-Variante der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II I567A Ni-Kante	CODH-II I567A Fe-Kante	CODH-II I567A Hochenergie S-Seite
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	1.4852	1.74086	1.88311
Raumgruppe	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>
Zellkonstanten			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.77, 75.75, 71.49	111.80, 75.62, 71.45	111.63, 75.82, 71.49
α , β , γ (°)	90.0, 111.09, 90.0	90.0, 111.09, 90.0	90.0, 111.09, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	545 482 / 83 095	337 128 / 52 571	260 437 / 40 308
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	6.0 (47.9)	6.3 (25.2)	5.3 (17.7)
CC _{1/2} ^b	99.9 (82.9)	99.9 (94.8)	99.9 (97.4)
CC _{ano}	53.8 (10.2)	53.2 (51.1)	11.9 (37.2)
Auflösung (Å)	41.01 – 1.53 (1.58 – 1.53)	40.98 – 1.78 (1.84 – 1.78)	41.01 – 1.95 (2.02 – 1.95)
Vollständigkeit (%)	99.15 (95.02)	98.76 (91.72)	99.18 (96.7)
<i>I</i> / σI	17.6 (2.6)	19.6 (4.9)	23.4 (7.4)

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

Tabelle A.8: Kristallographische Datentabelle für Varianten der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II C295D	CODH-II K563H
Datensammlung		
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2	C2
Zellkonstanten		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.87, 75.05, 71.73	111.84, 75.47, 71.34
α , β , γ (°)	90.0, 111.66, 90.0	90.0, 111.54, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	252 801 / 61 984	359 910 / 95 390
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	7.2 (60.3)	6.1 (73.3)
CC _{1/2} ^b	99.9 (77.1)	99.9 (73.9)
Auflösung (Å)	40.77 – 1.68 (1.74 – 1.68)	40.78 – 1.45 (1.50 – 1.45)
Vollständigkeit (%)	99.22 (98.26)	97.73 (96.69)
<i>I</i> / σI	12.7 (2.1)	12.8 (1.9)
Strukturverfeinerung		
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	16.00 / 18.74	12.03 / 15.69
Proteinmoleküle in der ASU	1	1
Ramachandran-Statistiken (%)		
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.99 / 2.69 / 0.32	97.15 / 2.53 / 0.32
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie		
Bindungen (Å)	0.014	0.014
Winkel (°)	2.016	1.929
ESU ^d	0.07	0.04

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.9: Kristallographische Datentabelle für die C295D-Variante der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II C295D Ni-Kante	CODH-II C295D Fe-Kante	CODH-II C295D Hochenergie S-Seite
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	1.479	1.73114	1.88311
Raumgruppe	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>
Zellkonstanten			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.69, 75.32, 71.66	111.96, 75.37, 71.56	111.91, 75.08, 71.73
α , β , γ (°)	90.0, 111.58, 90.0	90.0, 111.5, 90.0	90.0, 111.65, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	280 891 / 44 811	310 661 / 47 845	260 108 / 41 536
R_{meas} (%) ^a	26.9 (75.7)	9.6 (54.7)	5.8 (30.5)
$CC_{1/2}$ ^b	98.7 (80.9)	99.7 (80.0)	99.9 (92.4)
Auflösung (Å)	40.81 – 1.88 (1.95 – 1.88)	40.85 – 1.84 (1.90 – 1.84)	40.78 – 1.92 (1.99 – 1.92)
Vollständigkeit (%)	99.53 (99.64)	98.80 (95.10)	98.34 (90.14)
<i>I</i> / σI	10.3 (2.6)	11.3 (2.0)	18.6 (3.5)

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

Tabelle A.10: Kristallographische Datentabelle für die K563H- Variante der CODH-II_{Ch}.

	CODH-II K563H Ni-Kante	CODH-II K563H <i>pre</i> Ni-Kante	CODH-II K563H Fe-Kante	CODH-II K563H Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	1.48076	1.49379	1.73964	1.88311
Raumgruppe	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.78, 75.45, 71.29	111.82, 75.45, 71.29	111.86, 75.42, 71.26	111.79, 75.40, 71.29
α , β , γ (°)	90.0, 111.51, 90.0	90.0, 111.5, 90.0	90.0, 111.48, 90.0	90.0, 111.52, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	500 235 / 69 312	479 860 / 66 772	297 109 / 41 558	499 308 / 35 526
R_{meas} (%) ^a	6.9 (76.4)	5.2 (39.0)	6.1 (27.0)	4.5 (18.8)
$CC_{1/2}$ ^b	99.9 (76.2)	99.9 (91.9)	99.9 (95.1)	100.0 (98.8)
Auflösung (Å)	40.76 – 1.60 (1.66 – 1.60)	40.77 – 1.62 (1.68 – 1.62)	40.77 – 1.90 (1.97 – 1.90)	40.76 – 2.0 (2.07 – 2.0)
Vollständigkeit (%)	95.44 (92.1)	95.36 (92.06)	95.45 (90.84)	95.2 (91.88)
$I / \sigma I$	15.9 (1.8)	22.2 (3.7)	21.9 (5.4)	38.5 (10.3)

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

Tabelle A.11: Kristallographische Datentabelle für den -600 mV-Zustand der CODH-II_{Ch}.

	-600 mV	Ni-Kante	Fe-Kante	Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.47988	1.73477	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.15, 74.79, 70.96	112.14, 74.80, 70.95	112.08, 75.07, 71.04	112.09, 75.01, 71.03
α , β , γ (°)	90.0, 111.28, 90.0	90.0, 111.25, 90.0	90.0, 111.29, 90.0	90.0, 111.27, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	757 036 / 227 109	472 081 / 78 093	279 193 / 46 995	229 222 / 39 339
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	5.9 (57.6)	4.5 (13.8)	6.2 (16.9)	4.4 (13.1)
CC _{1/2} ^b	99.9 (66.3)	99.9 (98.5)	99.9 (97.8)	99.9 (98.6)
Auflösung (Å)	40.69 – 1.08 (1.12 – 1.08)	40.69 – 1.55 (1.61 – 1.55)	40.74 – 1.84 (1.91 – 1.84)	40.74 – 1.95 (2.02 – 1.95)
Vollständigkeit (%)	98.05 (97.07)	98.58 (98.41)	98.55 (99.15)	98.17 (94.11)
<i>I</i> / σI	11.9 (2.1)	26.7 (9.1)	20.3 (6.9)	26.1 (9.0)
Strukturverfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	11.76 / 14.49			
Proteinmoleküle in der ASU	1			
Ramachandran-Statistiken (%)				
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	97.15 / 2.53 / 0.32			
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie				
Bindungen (Å)	0.017			
Winkel (°)	1.898			
ESU ^d	0.02			

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.12: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} inkubiert 1 min mit O₂.

	1 min O ₂	Ni-Kante	Fe-Kante	Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.48076	1.73964	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.74, 75.50, 71.50	112.77, 75.58, 71.49	112.93, 75.63, 71.62	113.02, 75.65, 71.67
α , β , γ (°)	90.0, 111.77, 90.0	90.0, 111.59, 90.0	90.0, 111.71, 90.0	90.0, 111.79, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	272 110 / 79 336	411 979 / 59 133	246 636 / 35 700	176 530 / 25 453
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	5.8 (55.7)	8.1 (50.4)	6.6 (24.4)	4.6 (14.8)
CC _{1/2} ^b	99.9 (70.0)	99.8 (88.8)	99.9 (97.3)	99.9 (98.9)
Auflösung (Å)	40.82 – 1.53 (1.58 – 1.53)	40.9 – 1.69 (1.75 – 1.69)	40.91 – 2.0 (2.07 – 2.0)	40.91 – 2.24 (2.32 – 2.24)
Vollständigkeit (%)	94.56 (91.73)	94.58 (92.25)	94.17 (91.73)	93.85 (91.78)
<i>I</i> / σI	12.0 (1.8)	15.0 (3.2)	19.6 (6.0)	26.5 (10.3)
Strukturverfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	13.92 / 20.70			
Proteinmoleküle in der ASU	1			
Ramachandran-Statistiken (%)				
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.99 / 2.69 / 0.32			
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie				
Bindungen (Å)	0.013			
Winkel (°)	1.957			
ESU ^d	0.09			

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.13: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} inkubiert 35 min mit O₂.

	35 min O ₂	Ni-Kante	Fe-Kante	Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.48431	1.73477	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.39, 75.50, 71.46	112.95, 75.76, 71.81	113.10, 75.38, 71.84	113.04, 75.39, 71.80
α , β , γ (°)	90.0, 111.47, 90.0	90.0, 111.75, 90.0	90.0, 111.76, 90.0	90.0, 111.76, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	426 313 / 114 390	295 724 / 50 773	298 008 / 51 160	225 162 / 38 578
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	5.6 (66.7)	9.4 (49.3)	8.1 (64.3)	6.7 (37.3)
CC _{1/2} ^b	99.9 (62.3)	99.8 (81.4)	99.8 (77.6)	99.8 (91.11)
Auflösung (Å)	40.88 – 1.37 (1.42 – 1.37)	40.97 – 1.8 (1.86 – 1.8)	40.92 – 1.80 (1.86 – 1.80)	40.91 – 1.98 (2.05 – 1.98)
Vollständigkeit (%)	97.94 (94.14)	97.38 (96.63)	98.13 (92.84)	98.65 (98.41)
<i>I</i> / σI	12.3 (1.8)	12.5 (2.5)	11.58 (1.80)	16.6 (3.5)
Strukturverfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	12.53 / 16.00			
Proteinmoleküle in der ASU	1			
Ramachandran-Statistiken (%)				
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	97.30 / 2.38 / 0.32			
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie				
Bindungen (Å)	0.011			
Winkel (°)	1.812			
ESU ^d	0.05			

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.14: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} inkubiert 90 min mit O₂.

	90 min O ₂	Ni-Kante	Fe-Kante	Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.4852	1.73477	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.60, 74.70, 71.16	112.42, 74.79, 71.21	112.53, 74.65, 71.20	112.52, 74.67, 71.26
α , β , γ (°)	90.0, 111.37, 90.0	90.0, 111.32, 90.0	90.0, 111.38, 90.0	90.0, 111.37, 90.0
Reflexe gesamt / einzsigartig	491 930 / 128 771	432 750 / 62 735	303 324 / 45 710	207 448 / 30 510
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	8.7 (78.3)	5.1 (20.6)	5.9 (17.3)	4.7 (9.9)
CC _{1/2} ^b	99.8 (49.8)	99.9 (97.1)	99.9 (98.1)	99.9 (99.2)
Auflösung (Å)	40.73 – 1.30 (1.35 – 1.30)	40.77 – 1.65 (1.71 – 1.65)	40.73 – 1.83 (1.9 – 1.83)	40.75 – 2.1 (2.18 – 2.1)
Vollständigkeit (%)	95.71 (94.17)	94.91 (91.03)	94.31 (91.78)	94.82 (90.86)
<i>I</i> / σI	9.7 (1.5)	23.5 (6.5)	22.3 (7.7)	27.8 (13.0)
Strukturverfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	12.99 / 15.47			
Proteinmoleküle in der ASU	1			
Ramachandran-Statistiken (%)				
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	97.15 / 2.53 / 0.32			
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie				
Bindungen (Å)	0.011			
Winkel (°)	1.799			
ESU ^d	0.036			

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.15: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} inkubiert 4 h mit O₂.

	4 h O ₂	Ni-Kante	Fe-Kante	Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.48431	1.73477	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.41, 75.36, 71.35	112.69, 75.58, 71.68	112.40, 74.78, 71.52	112.73, 75.54, 71.66
α , β , γ (°)	90.0, 111.44, 90.0	90.0, 111.64, 90.0	90.0, 111.54, 90.0	90.0, 111.63, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	426 313 / 114 390	474 526 / 77 427	298 791 / 50 617	224 455 / 37 630
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	5.6 (66.7)	6.0 (65.1)	6.5 (47.1)	5.8 (22.5)
CC _{1/2} ^b	99.9 (62.3)	99.9 (80.0)	99.9 (85.3)	99.9 (96.5)
Auflösung (Å)	40.85 – 1.37 (1.42 – 1.37)	40.92 – 1.56 (1.62 – 1.56)	40.89 – 1.8 (1.86 – 1.8)	40.92 – 1.99 (2.06 – 1.99)
Vollständigkeit (%)	97.94 (94.14)	98.0 (94.97)	97.95 (95.73)	97.93 (97.48)
<i>I</i> / σI	12.3 (1.8)	15.9 (1.9)	16.3 (2.5)	19.4 (5.4)
Strukturverfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	15.00 / 20.21			
Proteinmoleküle in der ASU	1			
Ramachandran-Statistiken (%)				
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.83 / 2.85 / 0.32			
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie				
Bindungen (Å)	0.012			
Winkel (°)	1.712			
ESU ^d	0.07			

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.16: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} inkubiert 24 h mit O₂.

	24 h O ₂	Ni-Kante	Fe-Kante	Hochenergie S-Seite
Datensammlung				
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.48484	1.73405	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2	C2
Zellkonstanten				
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.91, 75.29, 70.83	112.49, 75.71, 71.49	112.51, 75.75, 71.49	112.43, 75.68, 71.48
α , β , γ (°)	90.0, 111.24, 90.0	90.0, 111.53, 90.0	90.0, 111.52, 90.0	90.0, 111.55, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	204 439 / 54 990	260 564 / 35 768	236 121 / 32 257	479 261 / 34 863
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	7.7 (77.0)	10.4 (102.8)	8.3 (82.0)	8.9 (110.9)
CC _{1/2} ^b	99.8 (76.7)	99.9 (73.0)	99.9 (78.8)	99.9 (77.3)
Auflösung (Å)	40.72 – 1.75 (1.81 – 1.75)	40.91 – 2.03 (2.10 – 2.03)	40.92 – 2.10 (2.18 – 2.10)	40.89 – 2.05 (2.12 – 2.05)
Vollständigkeit (%)	99.47 (99.8)	98.86 (98.6)	98.65 (98.03)	99.42 (98.08)
<i>I</i> / σI	11.0 (1.8)	14.1 (1.9)	15.4 (2.1)	19.5 (1.9)
Strukturverfeinerung				
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	16.96 / 20.84			
Proteinmoleküle in der ASU	1			
Ramachandran-Statistiken (%)				
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.20 / 3.49 / 0.32			
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie				
Bindungen (Å)	0.007			
Winkel (°)	1.219			
ESU ^d	0.21			

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.17: Kristallographische Datentabelle CODH-II_{Ch} inkubiert mit CN⁻ und O₂.

	CODH-II -320 mV	CODH-II -320 mV + CN ⁻	CODH-II -320 mV + CN ⁻ + O ₂
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	112.35, 74.50, 71.10	112.28, 75.28, 71.20	110.92, 75.25, 70.87
α , β , γ (°)	90.0, 111.26, 90.0	90.0, 111.46, 90.0	90.0, 111.09, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	331 179 / 90 370	347 166 / 95 003	180 377 / 52 565
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	8.4 (59.3)	6.6 (67.5)	13.1 (55.1)
CC _{1/2} ^b	99.7 (80.3)	99.9 (75.2)	99.2 (83.3)
Auflösung (Å)	40.7 – 1.46 (1.51 – 1.46)	40.78 – 1.46 (1.51 – 1.46)	40.7 – 1.74 (1.81 – 1.74)
Vollständigkeit (%)	94.86 (91.26)	99.26 (96.28)	94.65 (87.29)
<i>I</i> / σI	11.9 (2.1)	14.0 (1.9)	6.8 (1.8)
Strukturverfeinerung			
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	15.24 / 16.83	15.16 / 16.64	20.56 / 24.08
Proteinmoleküle in der ASU	1	1	1
Ramachandran- Statistiken (%)			
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	97.15 / 2.53 / 0.32	96.99 / 2.38 / 0.63	97.15 / 2.53 / 0.32
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie			
Bindungen (Å)	0.012	0.011	0.017
Winkel (°)	1.930	1.882	1.980
ESU ^d	0.05	0.35	0.12

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.18: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch} -320 mV + CN⁻ + O₂.

	CODH-II -320 mV + CN ⁻ + O ₂ Ni-Kante	CODH-II -320 mV + CN ⁻ + O ₂ Fe-Kante	CODH-II -320 mV + CN ⁻ + O ₂ Hochenergie S-Seite
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	1.4852	1.88311
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.59, 75.20, 70.92	112.0, 74.70, 70.76	112.43, 74.96, 71.04
α , β , γ (°)	90.0, 111.0, 90.0	90.0, 111.25, 90.0	90.0, 111.3, 90.0
Reflexe gesamt / einzigartig	309 994 / 48 947	123 992 / 17 155	382 517 / 37 811
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	18.7 (86.0)	6.5 (11.8)	7.3 (25.7)
CC _{1/2} ^b	98.2 (82.9)	99.8 (99.5)	99.9 (97.1)
Auflösung (Å)	40.79 – 1.80 (1.86 – 1.80)	40.61 – 2.56 (2.65 – 2.56)	40.75 – 1.95 (2.02 – 1.95)
Vollständigkeit (%)	96.37 (95.18)	97.12 (96.29)	94.38 (87.91)
<i>I</i> / σI	6.7 (1.9)	26.8 (14.7)	20.6 (6.1)

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

Tabelle A.19: Kristallographische Datentabelle für CODH-II_{Ch}.

	CODH-II C _{red2}	CODH-II Thionin-oxidiert ⁺	CODH-II C _{red2}
Datensammlung			
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841	0.91841	0.91841
Raumgruppe	C2	C2	C2
Zellkonstanten			
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	111.58, 74.51, 70.73	112.37, 74.98, 71.30	112.16, 75.37, 71.14
α , β , γ (°)	90.0, 111.16, 90.0	90.0, 111.31, 90.0	90.0, 111.3, 90.0
Reflexe gesamt/ einzigartig	268 162 / 70 467	441 281 / 116 331	364 506 / 96 707
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	7.1 (76.5)	8.2 (88.2)	9.0 (61.5)
CC _{1/2} ^b	99.9 (69.9)	99.8 (66.5)	99.7 (74.8)
Auflösung (Å)	40.57 – 1.6 (1.66 – 1.6)	40.82 – 1.36 (1.34 – 1.36)	40.82 – 1.45 (1.50 – 1.45)
Vollständigkeit (%)	98.96 (99.69)	98.49 (97.81)	99.05 (98.95)
<i>I</i> / σI	12.6 (1.7)	9.9 (1.5)	9.3 (1.9)
Strukturverfeinerung			
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	14.32 / 17.59	14.18 / 16.55	13.88 / 16.47
Proteinmoleküle in der ASU	1	1	1
Ramachandran-Statistiken (%)			
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	96.67 / 3.01 / 0.32	96.83 / 2.85 / 0.32	96.83 / 2.85 / 0.32
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie			
Bindungen (Å)	0.007	0.012	0.012
Winkel (°)	1.584	1.481	1.534
ESU ^d	0.16	0.16	0.15

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) (Diederichs und Karplus, 1997)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

Tabelle A.20: Kristallographische Datentabelle für CODH-IV_{Ch}.

	CODH-IV <i>as isolated</i>
Datensammlung	
Röntgenquelle	BESSY II, 14.1
Wellenlänge (Å)	0.91841
Raumgruppe	<i>P</i> 321
Zellkonstanten	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	209.15, 209.15, 93.41
α , β , γ (°)	90.0, 90.0, 120.0
Reflexe gesamt / einzigartig	1 260 515 / 79 240
<i>R</i> _{meas} (%) ^a	22.2 (180.6)
<i>R</i> _{pim} (%) ^a	5.4 (44.3)
CC _{1/2} ^b	99.9 (74.1)
Auflösung (Å)	46.7 – 2.52 (2.61 – 2.52)
Vollständigkeit (%)	99.95 (99.95)
<i>I</i> / σI	10.5 (1.4)
Strukturverfeinerung	
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%) ^c	23.52 / 27.47
Proteinmoleküle in der ASU	3
Ramachandran-Statistiken (%)	
bevorzugt/ erlaubt/ nicht erlaubt	95.86 / 4.03 / 0.11
RMS-Abweichungen von idealer Geometrie	
Bindungen (Å)	0.003
Winkel (°)	0.534
ESU ^d	0.36

Werte in Klammern sind für die höchste Auflösungsschale angegeben.

^a Redundanz-unabhängiger R-Faktor (Intensitäten) und *precision indicating merging* R-Faktor (Diederichs und Karplus, 1997; Weiss, 2001)

^b (Karplus und Diederichs, 2012)

^c Der freie R-Faktor (*R*_{free}) wurde aus 5 % der Daten berechnet, welche zufällig ausgewählt und vor der Verfeinerung aus dem Datensatz entfernt wurden.

^d Abgeschätzter Gesamtkoordinatenfehler (ESU, *estimated overall coordinate error*) auf Basis der *maximum-likelihood*-Methode (Lunin *et al.*, 2002).

8 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 02.10.2017

Lilith Domnik

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die Bereitstellung des spannenden und herausfordernden Themas und für seine Unterstützung während der vergangenen vier Jahre.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jae-Hun Jeoung für die Einführung in das Thema und die Bereitstellung seiner Plasmide und Strukturdaten. Danke für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen!

Ich danke auch Dr. Jochen Fessler für die Bereitstellung seiner Plasmide und für die wertvollen Tipps während der Anfangstage.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Vincent Fourmond und Mériem Merrouch möchte ich für die produktive Zusammenarbeit danken.

Ich danke ebenfalls meinen Kooperationspartnern innerhalb des Exzellenzclusters Unicat, insbesondere Prof. Dr. Hildebrandt und Dr. Alexandre Ciaccafava, für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Friederike Klemke, Sabine Nicklisch und Rainer Dietrich für ihre Unterstützung im Labor. Friederike danke ich insbesondere für die produktive Zusammenarbeit bei der Erstellung der Enzymvarianten.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit möchte ich mich bei Dr. Martin Bommer und Dr. Jae-Hun Jeoung bedanken.

Herzlicher Dank geht an meine Laborkollegen Barbara, Berta, Brinda, Felix, Gisa, Christina, Julian, Jochen, Kathryn, Martin, Sandra, Sebastian, Silke, Tobias und Yulia. Ich möchte auch den studentischen Hilfskräften Anastasia, Daniel, Florian, Noam und Stefan danken. Danke für die angenehme und freundliche Atmosphäre bei der Arbeit.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, die mich während der vergangenen vier Jahren unterstützt haben.